

# Indirekte und direkte Verfahren zum Nachweis von *Chlamydophila psittaci*-Infektionen bei deutschen Pferden unterschiedlicher Herkunft und Nutzung

**THOMAS HIRSCHHÄUSER**



**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

**Indirekte und direkte Verfahren zum Nachweis von  
*Chlamydophila psittaci*-Infektionen bei deutschen Pferden  
unterschiedlicher Herkunft und Nutzung**

**INAUGURAL-Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Thomas Hirschhäuser**

Tierarzt aus Freienfels (Hessen)

Gießen 2010

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

---

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Wehrend

Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2010

Meiner Familie

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Chlamydien-Infektionen bei Pferden .....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Die Biologie von Chlamydien.....	3
2.1.2 Taxonomie der Chlamydien.....	4
2.1.3 Epidemiologie von Chlamydien .....	6
2.1.4 Nachweis von Chlamydien-Infektionen.....	6
2.1.4.1 Indirekte Nachweismethoden.....	6
2.1.4.2 Direkte Nachweismethoden .....	7
2.1.5 Klinische Bedeutung der Chlamydien.....	8
2.1.5.1 Genitale Chlamydiose.....	8
2.1.5.2 Extragenitale Chlamydiose .....	9
2.1.6 Therapie der Chlamydiose .....	11
2.1.7 Bedeutung equiner Chlamydien als Zoonoseerreger.....	11
<b>2.2 Andere obligat intrazelluläre Bakterien bei Pferden.....</b>	<b>12</b>
2.2.1 Anaplasma- und Neorickettsia-Infektionen bei Pferden .....	12
2.2.1.1 Taxonomische Einordnung und biologische Eigenschaften.....	12
2.2.1.2 Anaplasmose bei Pferden .....	13
2.2.1.2.1 Klinik .....	13
2.2.1.2.2 Epidemiologie.....	14
2.2.1.2.3 Nachweis.....	15
2.2.1.2.4 Therapie.....	15
2.2.1.2.5 <i>A. phagocytophilum</i> -Infektionen als Zoonose .....	16
2.2.1.3 Neorickettsiose bei Pferden .....	17
2.2.1.3.1 Klinik .....	17
2.2.1.3.2 Epidemiologie.....	17
2.2.1.3.3 Nachweis.....	18
2.2.1.3.4 Therapie.....	19
2.2.2 <i>Lawsonia intracellularis</i> bei Fohlen (Equine Proliferative Enteropathy) .....	19
2.2.3 <i>Coxiella burnetii</i> bei Pferden.....	21

---

<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Untersuchungen, Tiere, Gewinnung und Art des Probenmaterials.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2 Indirekte Nachweismethoden .....</b>	<b>23</b>
3.2.1 Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR) .....	23
3.2.2 Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA).....	24
3.2.2.1 Beschichtung der Mikrotiterplatten .....	24
3.2.2.2 Durchführung des ELISA .....	25
3.2.2.3 Bestimmung des Grenzwertes ("Cut off").....	25
<b>3.3 Direkte Nachweismethoden .....</b>	<b>26</b>
3.3.1 Capture-Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (Capture-ELISA) .....	26
3.3.1.1 Vorbereitung der Nasen- und Zervixtupferproben.....	26
3.3.1.2 Durchführung .....	26
3.3.1.3 Bestimmung des Grenzwertes ("Cut off").....	27
3.3.2 Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	28
3.3.2.1 Untersuchung von Pferdespermaproben.....	28
3.3.2.1.1 Vorbereitung.....	28
3.3.2.1.2 Durchführung .....	28
3.3.2.2 Untersuchung von Nasen- und Zervixtupferproben.....	29
3.3.2.2.1 Vorbereitung der Tupferproben .....	29
3.3.2.2.2 Durchführung .....	29
3.3.2.3 Analytische Agarose-Gel-Elektrophorese.....	30
3.3.3 Kulturelle Untersuchungen .....	30
3.3.3.1 Versuch zur Kultivierung von Chlamydien aus Probenmaterialien unter Verwendung von Zellkulturen .....	30
3.3.3.1.1 Vorbereitung des Probenmaterials .....	31
3.3.3.1.2 Beimpfen der Zellkulturen, Anlegen von Passagen .....	31
3.3.3.1.3 Anfärbung der Deckglaskulturen mit der Methode nach Giménez .....	32
3.3.3.2 Versuch zur Kultivierung von Chlamydien unter Verwendung von embryonierten Hühnereiern .....	32
3.3.3.2.1 Vorbebrütung .....	32
3.3.3.2.2 Vorbereitung des Probenmaterials .....	32
3.3.3.2.3 Anzüchtung von Chlamydien aus klinischem Probenmaterial .....	33
3.3.3.2.4 Giménez-Färbung .....	33
<b>3.4. Statistische Auswertung .....</b>	<b>34</b>

<b>4. Ergebnisse</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Nachweis von Antikörpern gegen Chlamydien bei verschiedenen Pferderassen unterschiedlichen Alters</b>	<b>35</b>
<b>4.2 Nachweis von Chlamydien-Antikörpern mit dem ELISA und Chlamydien-Antigen mit dem Capture-ELISA bei 95 hessischen Großpferden</b>	<b>36</b>
4.2.1 Einfluß des Geschlechtes auf die Häufigkeit positiver Befunde im Rahmen der Chlamydiendiagnostik	37
4.2.2 Einfluß des Alters auf die Häufigkeit positiver Befunde im Rahmen der Chlamydiendiagnostik	38
4.2.3 Einfluß der Nutzung auf die Häufigkeit positiver Befunde im Rahmen der Chlamydiendiagnostik	39
4.2.4 Einfluß der Haltungsform auf die Häufigkeit positiver Befunde im Rahmen der Chlamydiendiagnostik	40
4.2.5 Einfluß der Betriebsgröße auf die Häufigkeit positiver Befunde im Rahmen der Chlamydiendiagnostik	41
<b>4.3 Serologische Verlaufsuntersuchung auf Chlamydien bei Vollblutdeckhengsten (n=9)</b>	<b>42</b>
<b>4.4 Nachweis Chlamydien spezifischer Gensequenzen mit der PCR in Pferdespermproben von deutschen Deck- und Besamungshengsten</b>	<b>43</b>
<b>4.5 Verlaufsuntersuchung mit verschiedenen indirekten und direkten Nachweismethoden</b>	<b>43</b>
4.5.1 Ergebnisse der serologischen Verlaufsuntersuchung	43
4.5.2 Ergebnisse der Verlaufsuntersuchung unter Verwendung direkter Nachweismethoden (PCR, Capture-ELISA, Zellkulturmethode und Kultivierungsmethode in embryonierten Hühnereiern)	44
4.5.3 Zusammenfassende Darlegung der Befunde zum Antikörper- und Erreger-Nachweis im Rahmen der Verlaufsuntersuchung	45
<b>5. Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>49</b>
<b>5.1 Seroprävalenzstudien</b>	<b>49</b>
<b>5.2 Direkte Nachweismethoden</b>	<b>51</b>
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>55</b>
<b>7. Summary</b>	<b>57</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>58</b>
<b>9. Anhang</b>	<b>78</b>
9.1 Chemikalien und Reagenzien allgemein	78
9.2 KBR	80
9.3 ELISA	80



---

9.4 Capture-ELISA.....	81
9.5 PCR.....	83
9.6 Kultivierungsmethode im embryonierten Hühnerei.....	84
9.7 Zellkulturmethode .....	86
9.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	88

**Abkürzungsverzeichnis**

A.	Anaplasma
Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata
BGM	Buffalo-Green-Monkey
Biov.	Biovar
comb.	Combinatio
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS, DNA	Desoxyribonukleinsäure, Desoxyribonucleic Acid
EBE	Einschluß-Bildende-Einheit
EGA	Equine Granulozytäre Ehrlichiose
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
FAK	Fangantikörper
fam.	Familia
g	Erdbeschleunigung, Gramm
Ig	Immunoglobulin
K	Konjugat
Kb	Kilobasen
KBR	Komplement-Bindungs-Reaktion
kg	Kilogramm
L.	Lawsonia
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MAK	Monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOMP	Major Outer Membrane Protein
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
N.	Neorickettsia
NAK	Nachweisantikörper
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nov.	Nova
PBS	Phosphat-Buffered-Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RAO	Recurrent Airway Obstruction
RNS, RNA	Ribonukleinsäure, Ribonucleic Acid
S	Substrat
sp.	Spezies
SPF	Spezifisch-Pathogen-Frei
Syn.	Synonym
Tab.	Tabelle
U/Min	Umdrehung/Minute

UV	Ultraviolett
V.	Vena
V/M	Volt/Meter



## **1. Einleitung**

Spezies der Gattungen *Chlamydia* und *Chlamydophila*, die im folgenden als „Chlamydien“ zusammengefaßt werden, zählen zu den am weitesten verbreiteten Bakterien. Es handelt sich um obligat intrazelluläre, kokkoide, unbewegliche, gramnegative Bakterien mit einem für Bakterien einzigartigen Entwicklungszyklus, der nur in einer Wirtszelle erfolgen kann.

Zahlreiche Säuger-Spezies, inklusive dem Menschen, als auch Vögel und Amphibien sind für Infektionen mit diesen Erregern empfänglich. Ist der Mensch nachweislich in eine Infektionskette einbezogen, gilt die entsprechende *Chlamydia*- oder *Chlamydophila*-Spezies als Zoonoseerreger und der Nachweis bei unseren Haustieren unterliegt der Meldepflicht. Die Psittakose, definiert als Infektion der Psittaziden mit *Chlamydophila psittaci*, ist dagegen wegen der hohen Virulenz des Erregers für den Menschen anzeigepflichtig. Allein aus dem Gefährdungspotential für den Menschen heraus ist Infektionen mit *Chlamydia*- und/oder *Chlamydophila*-Spezies große Bedeutung beizumessen. Darüber hinaus werden sie aber auch als mögliche Ursache einer Vielzahl von Krankheitsbildern bei Haus- und Nutztieren diskutiert.

Bei Schafen spielen Chlamydien eine Rolle als Ursache des Enzootischen Abortes. Rinder können nach Infektionen Aborte und Fruchtbarkeitsstörungen aufweisen.

Beim Schwein sind Chlamydien bei Aborten, Fruchtbarkeitsstörungen, Pneumonie, Konjunktivitis, Polyarthrit, Perikarditis, Polyserositis und Enteritis nachgewiesen worden. Bei Katzen werden Chlamydien als eine der Ursachen des Katzenschnupfens diskutiert.

Eine Ausnahme machen Pferde. Verglichen mit der Anzahl von Berichten über *Chlamydia*-/*Chlamydophila*-Infektionen bei den anderen jahrhundertelangen Begleitern des Menschen liegt für das Pferd nur ein sehr überschaubarer Umfang vor.

Bei ihnen werden zwar gelegentlich *Chlamydia*-/*Chlamydophila*-Spezies bei Symptomen wie Rhinitis, Keratokonjunktivitis, Pneumonie, Polyarthrit, Enzephalohepatitis und Aborten nachgewiesen. Es wird aber nach wie vor diskutiert, ob diesen Befunden eine

ätiologische Bedeutung beizumessen ist. Argumente hierfür sind entsprechend häufige Berichte über Infektionen mit diesen Erregern bei klinisch gesunden Tieren.

Vor diesem Hintergrund stellte sich zunächst für die vorliegende Arbeit die Frage nach der Verbreitung von Infektionen mit Spezies der Familie Chlamydiaceae beim Pferd.

Darüber hinaus sollte erarbeitet werden, ob spezifische Einflußgrößen wie Geschlecht, Alter, Nutzung, Haltungsform und Betriebsgröße auf die Seroprävalenz existieren.

Abschließend war die These über die venerische Übertragung zu prüfen. Von Seiten der methodischen Vorgehensweise waren sowohl direkte als auch indirekte Verfahren im Hinblick auf ihre jeweilige Bedeutung im Rahmen der Beantwortung der Fragestellungen zu beurteilen.

## **2. Literaturübersicht**

### **2.1 Chlamydien-Infektionen bei Pferden**

#### **2.1.1 Die Biologie von Chlamydien**

Chlamydien sind obligat intrazelluläre, kokkoide, stets unbewegliche Mikroorganismen, welche sich ausschließlich im Zytoplasma eukariotischer Zellen vermehren.

Mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht ihres Genoms von  $4\text{-}6 \times 10^8$  Dalton sind Chlamydien die kleinsten unter den bekannten Prokaryonten (MOULDER et al., 1984). Sie besitzen eine jeweils dreischichtige Zellwand und Plasmamembran (TRIBBY, 1970). Die Zusammensetzung ihrer Zellwand entspricht weitgehend der gram-negativer Bakterien, allerdings fehlt ihnen das Peptidoglykan, das eine zellwandstabilisierende Funktion besitzt (GARRET et al., 1974). Diese Funktion scheint das cysteinreiche „major outer membrane protein“ (MOMP) zu erfüllen, welches daneben antigene Determinanten trägt (CALDWELL et al., 1981; CALDWELL und JUDD, 1982).

Die Vermehrung der Chlamydien erfolgt durch Zweiteilung in eukariotischen Wirtszellen. Als "Energieparasiten" benötigen Chlamydien Wirtszellen, um den Pentose-Phosphat-Weg und den Citrat-Zyklus zur Energiebereitstellung durchführen zu können (MC CLARTY und FAN, 1993; MC CLARTY und QIN, 1993).

Chlamydien vermehren sich bevorzugt in Epithelzellen der Konjunktiva, des Respirationsapparates, des Intestinal- und des Genitaltraktes. Weiterhin sind Synovialzellen und embryonales Gewebe als Wirtszellen von Bedeutung (SHEWEN, 1980).

Während der Replikation findet man morphologisch verschiedene Formen. Die Retikularkörperchen ( $0,5\text{-}2\mu\text{m}$ ), zwei Übergangsformen ( $0,3\text{-}1\mu\text{m}$ ) und die Elementarkörperchen ( $0,2\text{-}0,3\mu\text{m}$ ). Die Retikularkörperchen stellen die intrazelluläre Vermehrungsform und die Elementarkörperchen das freie infektiöse Stadium dar. Nach Anlagerung an die Zellwand der Wirtszelle werden Chlamydien durch Endozytose aufgenommen. Es wird davon ausgegangen, daß es auch noch andere Mechanismen

gibt, in die Wirtszelle einzudringen (WARD und MURRAY, 1984; HODINKA und WYRICK, 1986; HODINKA et al., 1988).

Die maximale Endozytoserate wird bei einer Temperatur von 35-40°C erreicht (FRIIS, 1972). Die endozytierten Einschlußkörperchen befinden sich in einer durch die Plasmamembran gebildeten Vakuole und differenzieren sich innerhalb von sechs bis acht Stunden über die erste Übergangsform zu Retikularkörperchen. Vier bis sechs Stunden danach beginnt die Zweiteilung, wobei mehrere Teilungszyklen ablaufen und bis zu 1000 Retikularkörperchen in einer Wirtszelle gebildet werden können (MOULDER et al., 1984). Nach den Teilungen differenzieren sich die Retikularkörperchen über die zweite Übergangsform zu Elementarkörperchen.

Etwa 40-60 Stunden nach Infektion der Wirtszelle erfolgt die Freisetzung ausdifferenzierter Einschlußkörperchen aus der Wirtszelle durch Freisetzung lytischer Enzyme aus den Lysosomen (STORZ, 1971). Persistierende Infektionen, bei denen die Bakterien bei Teilung der Wirtszelle in die Tochterzellen gelangen, sind ebenfalls möglich (MANIRE und GALASSO, 1959; PÉREZ-MARTINEZ und STORZ, 1985).

### **2.1.2 Taxonomie der Chlamydien**

EVERETT et al. (1999) bezogen im Rahmen ihres Vorschlages zur Neuklassifizierung der Ordnung Chlamydiales neben den bisherigen Daten phylogenetische Analysen der 16 S- und 23 S-rRNA mit ein.

Der Vorschlag von EVERETT et al. (1999) differenziert die Ordnung Chlamydiales in vier Familien: Chlamydiaceae, Simkaniaceae, Parachlamydiaceae und Waddliaceae. Die Spezies der Familie Chlamydiaceae weisen eine Übereinstimmung der 16 S-rRNS von über 90% auf. Die drei übrigen Familien weisen zu der Familie Chlamydiaceae eine Übereinstimmung der 16 S-rRNS von 80-90% auf (Tab. 1).

Die Etablierung neuer Spezies sowie die Nomenklatur erfolgte unter Berücksichtigung des „international code of nomenclature of bacteria“ (LAPAGE et al., 1992).



**Tabelle 1:**

<b>Taxonomie der Ordnung der Chlamydiales (EVERETT et al., 1999)</b>
<i>Ordnung:</i> Chlamydiales
<p><i>Familie:</i> Chlamydiaceae</p> <p><i>Genus:</i> Chlamydia</p> <p><i>Spezies:</i> <i>Chlamydia trachomatis</i> (2 Biovare)  <i>Chlamydia muridarum</i> (sp.nov.)  <i>Chlamydia suis</i> (sp.nov.)</p> <p><i>Genus:</i> Chlamydophila</p> <p><i>Spezies:</i> <i>Chlamydophila psittaci</i> (comb.nov.)  <i>Chlamydophila abortus</i> (sp.nov.)  <i>Chlamydophila caviae</i> (sp.nov.)  <i>Chlamydophila felis</i> (sp.nov.)  <i>Chlamydophila pneumoniae</i> (comb.nov., 3 Biov.)  <i>Chlamydophila pecorum</i> (com.nov.)</p>
<p><i>Familie:</i> Simkaniaceae (fam.nov.)</p> <p><i>Genus:</i> Simkania</p> <p><i>Spezies:</i> <i>Simkania negevensis</i> (sp.nov.)</p>
<p><i>Familie:</i> Parachlamydiaceae</p> <p><i>Genus:</i> Parachlamydia</p> <p><i>Spezies:</i> <i>Parachlamydia acanthamoebae</i> (sp.nov.)</p>
<p><i>Familie:</i> Waddliaceae</p> <p><i>Genus:</i> Waddlia</p> <p><i>Spezies:</i> <i>Waddlia chondrophila</i> (sp.nov.)</p>

### **2.1.3 Epidemiologie von Chlamydien**

Chlamydien-Infektionen sind im Tierreich und auch beim Menschen weit verbreitet. Viele Stämme weisen eine mäßige Wirts- und Gewebespezifität auf, was für ihre Ausbreitung von besonderer Bedeutung ist (STORZ, 1988).

Chlamydiale Organismen, die beim Pferd isoliert wurden, sind meist unklassifiziert. Aus diesem Grunde sind epidemiologisch und ätiologisch relevante Aspekte der Erreger-Wirts-Beziehungen, die bei anderen Tierarten gut dokumentiert sind, beim Pferd noch unklar (WITTENBRINK, 1999).

### **2.1.4 Nachweis von Chlamydien-Infektionen**

#### **2.1.4.1 Indirekte Nachweismethoden**

Mit indirekten Nachweisverfahren werden Antikörper gegen Chlamydien nachgewiesen. Überwiegend beruhen die Tests auf dem Nachweis von Immunglobulin G (IgG) gegen das genusspezifische Lipopolysaccharidantigen (LPS-Antigen). Häufig eingesetzte Verfahren sind die Komplementbindungsreaktion (KBR), der Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) und der Indirekte Immunfluoreszenztest (DRACHENBERG und SCHUMANN, 1985; PÉREZ- MARTINEZ et al., 1986; FUDGE, 1989; GRIMES, 1989; QUEHENBERGER et al., 1990).

In seroepidemiologischen Studien beim Pferd kam fast ausschließlich die KBR zur Anwendung (POPOVICI und HIASTRU, 1968; STUDDERT, 1969; NEUVONEN und ESTOLA, 1974; SCHMATZ et al., 1977; CSUKÁS et al., 1984; FUKUSHI et al., 1985; MIJAMOTO et al., 1993).

Während mit der KBR nur Antikörper gegen das genusspezifische Chlamydien-Antigen nachgewiesen werden, können ELISA und Immunfluoreszenztest durch Einsatz entsprechender Antigene neben der Gattungs- auch zur Speziesdiagnose genutzt werden (MARDH et al., 1989).

Der ELISA bietet zudem den Vorteil, daß er für die Untersuchung größeren Umfanges eher geeignet ist als die KBR. Im Gegensatz zur KBR können mittels ELISA auch hämolytische und antikomplementäre Seren untersucht werden.

#### **2.1.4.2 Direkte Nachweismethoden**

Ein Verdacht auf Vorliegen einer Chlamydien-Infektion kann bereits ohne Kultivierung durch mikroskopische Untersuchung erfolgen. Das ist aber nur bei einer sehr hohen Bakteriendichte möglich (WITTENBRINK und BISPING, 1987). Nach MEISSLER und KRAUSS (1980) sind zum mikroskopischen Direktnachweis  $3 \times 10^6$  Chlamydien in 1ml Probenmaterial notwendig.

Verschiedene Methoden eignen sich zum Nachweis von Chlamydien-Antigen und Chlamydien-spezifischer DNS. Hierzu zählen der Capture-ELISA (Capture-Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay; THIELE et al., 1992; VANROMPAY et al., 1994), der Immunfluoreszenztest (TIMMS et al., 1988), der Immunperoxidasetest (WOODLAND et al., 1978; VEZNIK et al., 1996), die Peroxidase-Anti-Peroxidase-Methode (MOORE et al., 1991) und die DNS-Hybridisation (TIMMS et al., 1988).

Seit Beginn der neunziger Jahre kommen auch die PCR (Polymerase Chain Reaction) und die Ligase-Kettenreaktion in der Chlamydien-Diagnostik zur Anwendung (SAIKI et al., 1988; FISCHER, 1995; SACHSE und GROSSMANN, 2002). Diese beiden letztgenannten Verfahren beruhen auf der spezifischen Vervielfältigung bestimmter Genomabschnitte. Sie zeichnen sich durch hohe Sensitivität und Spezifität aus. Vorteilhaft ist, daß für die Durchführung keine lebenden Erreger benötigt werden. Die amplifizierten DNS-Abschnitte können durch Agarosegelelektrophorese, Southern-Blot-Hybridisierung dargestellt und mittels Restriktionsendonuklease-Analyse oder Sequenzierung analysiert werden.

Die Chlamydien-Anzüchtung kann in Zellkulturen oder mit embryonierten Hühnereiern (KÖLBL, 1969; STORZ, 1971) durchgeführt werden. Oft werden mehrere Passagen benötigt, bevor eine erkennbare Vermehrung der Bakterien stattfindet. Buffalo-Green-Monkey (BGM-), L 929- und Mc Coy-Zellen kommen bei der Anzüchtung von

Chlamydien häufig zur Anwendung (KRECH et al., 1989; VANROMPAY et al., 1992; JOHNSTON und SIEGEL, 1992).

Zur Vermehrung von Chlamydien kann auch die Inokulation von Probenmaterial in Labortiere (intraperitoneal, -nasal oder -cerebral) genutzt werden. Mäuse und Meerschweinchen erwiesen sich dazu unter Praxisbedingungen am geeignetsten.

Die Darstellung angezüchteter Chlamydien erfolgt mittels Anfärbung und mikroskopischer Untersuchung auf Objektträgern fixierter Erregersuspensionen. Geeignet sind die Färbungen nach STAMP et al. (1950), GIMÉNEZ (1964), CAMPBELL (1988) oder nach GIEMSA. Weitere Färbemethoden werden von DAGNALL und WILSMORE (1990) und von MARDH et al. (1989) beschrieben.

## **2.1.5 Klinische Bedeutung der Chlamydien**

### **2.1.5.1 Genitale Chlamydiose**

Das Vorkommen chlamydienbedingter Aborte beim Pferd wird als selten angesehen (POPOVICI und HIASTRU, 1968; GLAVITS et al., 1988). Erstmals wurde von POPOVICI und HIASTRU (1969) von chlamydienbedingten Aborten bei Stuten berichtet. DILBECK et al. (1985) konnten bei elf von zwanzig abortierten Feten Chlamydien mittels Immunfluoreszenztechnik nachweisen. GLAVITS et al. (1988) gelang der licht- und elektronenmikroskopische Nachweis bei zwei abortierten Zwillingsfeten im Mageninhalt, in den Magenschleimhäuten und in den Eihäuten. BOCKLISCH et al. (1991) und HENNING et al. (2000) konnten Chlamydien aus Abortmaterial eines Pferdes isolieren. Im Gegensatz dazu gelang es weder MOORTHY und SPRADBROW (1978) noch BISPING (1993), Chlamydien bei abortierten Pferdefeten nachzuweisen. Die Untersuchungen von FORSTER et al. (1997) an 191 abortierten Feten verliefen ebenfalls negativ. Beim Chlamydien-Abort der Stute handelt es sich häufig um Spätaborte zwischen dem achten und elften Monat (DILBECK et al., 1985; GLAVITS et al., 1988).

Den Berichten in der Literatur zu Folge sind demnach chlamydienbedingte Aborte tatsächlich selten oder aber entziehen sich sehr häufig dem diagnostischen Zugriff.

POPOVICI und HIASTRU (1969) bzw. HENNING et al. (2000) diskutieren einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Stutenaborten und dem Vorliegen von Atemwegserkrankungen in manchen Beständen. Ob Chlamydien-Infektionen zusätzlich zu Infertilität bei Stute und Hengst führen können, wird kontrovers diskutiert (WITTENBRINK, 1999).

HUELSEY (1999) diagnostizierte bei Stuten mit positivem elektronen-mikroskopischem Chlamydien-Nachweis eine signifikant erhöhte Unfruchtbarkeits- und Güstrate. HERFEN et al. (1999) konnten diese Ergebnisse im Rahmen einer Untersuchung bestätigen. Eine signifikante Korrelation zwischen Chlamydien-Nachweis und dem Vorliegen von klinischen Befunden wie Vestibulitis, Vaginitis und Endometritis konnte aber nicht festgestellt werden.

VEZNIK et al. (1996) konnten Chlamydien-Antigen in Pferdesperma nachweisen. Deshalb vermuten sie, daß die venerische Übertragung einen möglichen Infektionsweg bei der Tierart Pferd darstellt. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte auch einen Zusammenhang zwischen Chlamydien-Nachweis im Sperma und der funktionellen bzw. morphologischen Qualität des Spermas feststellen.

#### **2.1.5.2 Extragenitale Chlamydiose**

Seroepidemiologische Studien zeigen, daß Chlamydien-Infektionen beim Pferd weit verbreitet sind (POPOVICI und HIASTRU, 1968; STUDDERT, 1969; NEUVONEN und ESTOLA, 1974, FUKUSHI et al., 1985; MIYAMOTO et al., 1993). Die bisher durchgeführten seroepidemiologischen Studien in Europa ergaben Seroprävalenzen zwischen 4,1-26,5%.

MIYAMOTO et al. (1993) erhielten im Rahmen einer seroepidemiologischen Studie an 599 japanischen Warmblutpferden eine Seroprävalenz von 15,2%. Die Seroprävalenzen in verschiedenen geographischen Bezirken reichten bei dieser Untersuchung von 6-

56%. MIYAMOTO et al. (1993) begründen diese Schwankungen mit dem Vorliegen von Epidemien in den untersuchten Bezirken.

Bei Untersuchungen von FUKUSHI et al. (1985) an 1103 japanischen Pferden betrug die Seroprävalenz 2,1%. Vergleichende serologische Studien an atemwegserkrankten und klinisch gesunden Pferden ergaben einen signifikant höheren Anteil seropositiver Tiere bei den klinisch auffälligen Tieren (POPOVICI und HIASTRU, 1969; SCHMATZ et al., 1977).

MC CHESNEY et al. (1982) bewerten die Isolierung chlamydialer Organismen aus dem Respirationstrakt atemwegserkrankter Pferde als Hinweis für eine ätiologische Bedeutung bei Atemwegserkrankungen.

THEEGARTEN et al. (2008) konnten bei Pferden mit der Atemwegserkrankung RAO (Recurrent Airway Obstruction) signifikant häufiger *Chlamydophila psittaci* nachweisen als bei klinisch gesunden Pferden. Zudem wurde ein Zusammenhang zwischen der Stärke des Krankheitsbildes und dem Nachweis von Chlamydien in Bronchialgewebe aufgezeigt.

GAEDE et al. (2008) wiesen erstmalig *Chlamydophila caviae* in einem Pferdebestand nach, in dem zum Zeitpunkt der Probenentnahme Pneumonien und Konjunktividen vorlagen.

Der häufige Nachweis von Chlamydien in Probenmaterial klinisch gesunder Pferde weist auf eine Bedeutung klinisch inapparenter Infektionen hin (WITTENBRINK, 1999).

Zwei Arbeitsgruppen beschreiben Infektionsversuche mit chlamydialen Isolaten an Pferden. MC CHESNEY et al. (1982) führten eine experimentelle intratracheale Infektion mit einem nicht klassifizierten Isolat an einem Pony durch. Eine klinische Symptomatik konnte dadurch nicht hervorgerufen werden. Es wurden aber histologische Veränderungen in Form einer interstitiellen Pneumonie und herdförmigen Hepatozytennekrosen nachgewiesen, die auf eine Chlamydien-Infektion hinweisen können.

MAIR und WILLS (1992) führten eine experimentelle Infektion intrakonjunktival,- nasal und -bronchial mit dem *Chlamydia pneumoniae*-Isolat N16 an je zwei Ponys durch. Eine klinische Symptomatik konnte ebenfalls nicht festgestellt werden.

MAIR und WILLS (1992) sehen keinen Zusammenhang zwischen Chlamydien-Isolierung, dem Alter, Zuchtgeschehen und dem Vorhandensein klinischer Symptome.

Diskutiert wird zudem eine ätiologische Bedeutung von Chlamydien bei verschiedenen anderen Krankheitsbildern bei Pferden wie Polyarthrit (MC CHESNEY et al., 1974), Hepatitis (BLANCO-LOIZELIER und PAGE, 1974), Konjunktivitis (BURELL et al., 1986; MAIR und WILLS, 1992) und dem Hepatoenzephalitis-Syndrom (MC CHESNEY et al., 1974).

### **2.1.6 Therapie der Chlamydiose**

Bislang liegen keine Studien zur Therapie von Chlamydien-Infektionen beim Pferd vor. Vergleichende Studien über die Wirksamkeit einzelner Chemotherapeutika gegen verschiedene Chlamydien-Stämme bei anderen Tierarten und in vitro belegen, daß sich Tetrazykline, insbesondere Mino- und Doxzyklin, sehr gut zur Therapie von Chlamydien-Infektionen eignen (BUTAYE et al., 1997; MIJASHITA et al., 1997).

Eine gute Wirksamkeit wird auch für die Quinolon-Derivate Enro- und Sparfloxacin (NAKATA et al., 1992; KIMURA et al., 1993; BUTAYE et al., 1997) und die Makrolid-Antibiotika Clarithro- und Asithromycin (KUO et al., 1996; MIJASHITA et al., 1997) beschrieben.

### **2.1.7 Bedeutung equiner Chlamydien als Zoonoseerreger**

Spezies der Ordnung Chlamydiales, insbesondere *Chlamydophila psittaci*, können als Zoonoseerreger Erkrankungen beim Menschen hervorrufen (STORZ, 1971).

Vertreter der Klasse Aves, insbesondere die Psittaciformes, stellen mit Abstand die Hauptinfektionsquelle für Menschen dar (WACHENDÖRFER und LOHRBACH, 1980; SCHMEER et al., 1987; KALETA et al., 1998).

Auch landwirtschaftliche Nutztierarten, neben Schafen vor allem Rinder und Schweine (WACHENDÖRFER und LOHRBACH, 1980; STING et al., 1997), sowie Haustierarten wie Hund und Katze (WACHENDÖRFER und LOHRBACH, 1980; SCHMEER et al., 1987) kommen als Infektionsquelle für den Menschen in Frage.

Ob auch Pferde eine Ansteckungsquelle für den Menschen sein können, ist nicht bekannt.

## **2.2 Andere obligat intrazelluläre Bakterien bei Pferden**

### **2.2.1 Anaplasma- und Neorickettsia-Infektionen bei Pferden**

#### **2.2.1.1 Taxonomische Einordnung und biologische Eigenschaften**

Im Jahr 2001 erfolgte die Neuordnung der Taxonomie der Ordnung Rickettsiales (DUMLER et al., 2001).

Aufgrund einer sehr hohen Ähnlichkeit in der 16S-rRNS-Basensequenz wurden die Bakterienarten *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophilum* und das Agens der Humanen Granulozytären Ehrlichiose zu der Bakterienart *Anaplasma (A.) phagocytophilum* zusammengefaßt.

Die Bakterienart *Ehrlichia risticii* wurde umbenannt in *Neorickettsia (N.) risticii*.

Innerhalb der Familie der Anaplasmataceae gelten *Anaplasma phagocytophilum* und *Neorickettsia risticii* als pathogen für das Pferd (DUMLER et al., 2001; RIKIHISA et al., 2004).

Bei *Anaplasma phagocytophilum* und *Neorickettsia risticii* handelt es sich um obligat intrazelluläre, gram-negative Bakterien, die sich in phagosomalen Vakuolen im Zytoplasma ihrer Wirtszellen vermehren (RISTIC et al., 1986; RIKIHISA, 1999). Die Vermehrung erfolgt durch Zweiteilung (SMITH und RISTIC, 1977; RIKIHISA, 1990).

*N. risticii* wird vorwiegend in Makrophagen, Darmdrüsenepithel und gelegentlich in Monozyten nachgewiesen. Wirtszellen von *A. phagocytophilum* sind hauptsächlich neutrophile und eosinophile Granulozyten (RIKIHISA, 1999).



## **2.2.1.2 Anaplasmosen bei Pferden**

### **2.2.1.2.1 Klinik**

Die Inkubationszeit bei der Equinen Granulozytären Anaplasmosen (EGA) beträgt im Infektionsversuch nach Übertragung von Frischblut eines infizierten Pferdes ein bis neun Tage (GRIBBLE, 1969). Im Rahmen eines Infektionsversuches mit infizierten Zecken (*Ixodes pacificus*), die Pferden angesetzt wurden, betrug die Inkubationszeit 18-25 Tage (LEWIS et al., 1975).

Das klinische Bild ist geprägt von Fieber (38,8-41,6°C) mit einer durchschnittlichen Dauer von fünfeinhalb Tagen (PUSTERLA et al., 2000). Weitere Symptome sind Apathie und Anorexie in unterschiedlichem Ausmaß und Dauer (MADIGAN, 1993; ENGVALL et al., 1996; PUSTERLA et al., 1998). Unterhautödeme können in den meisten Fällen diagnostiziert werden (MADIGAN, 1993; PUSTERLA et al., 2000). Petechiale Blutungen, Ikterus, Koordinationsstörungen, Orchitis und Herzrhythmusstörungen treten ebenfalls gelegentlich auf (MADIGAN und GRIBBLE, 1987; V.D. KOLK et al., 1993; BARLOUGH et al., 1995). Unter den Veränderungen des Blutbildes befinden sich häufig Leuko-, Erythro- und Thrombozytopenie (V.D. KOLK et al., 1993; PUSTERLA et al., 2000). Differentialdiagnosen sind der Komplex der Lebererkrankungen, Meningitis, Hämorrhagische Diathese, Infektiöse Anämie und die Equine Arteritis (MADIGAN und GRIBBLE, 1987).

Bei jungen Pferden (<vier Jahre) ist der Krankheitsverlauf häufig weniger schwerwiegend. Insbesondere bei Jährlingen werden Fälle beschrieben, bei denen nur eine kurze Fieberphase beobachtet werden konnte (MADIGAN und GRIBBLE, 1987). Die Inkubationszeit beträgt im Infektionsversuch drei bis zehn Tage (MADIGAN und GRIBBLE, 1987; MUNDERLOH et al., 1996). Das Vorkommen von chronischen Erkrankungen bzw. latenten Infektionen ist nicht bekannt (GRIBBLE, 1969; NYINDO et al., 1978). Die Letalität ist bei Ausbleiben von Ataxie, schweren Folgeverletzungen und Sekundärinfektionen niedrig (MADIGAN und GRIBBLE, 1987; RIKIHISA et al., 2004).

### **2.2.1.2.2 Epidemiologie**

Die Equine Granulozytäre Anaplasmose (EGA) wurde erstmals 1969 in Nordkalifornien (USA) diagnostiziert (GRIBBLE, 1969; STANNARD et al., 1969). In Deutschland wurden Anaplasmosen bei Pferden erstmalig 1982 und 1987 nachgewiesen (FRIEDHOFF, 1982; GERHARDS et al., 1987).

*A. phagocytophilum*-Infektionen sind vektorabhängig (RIKIHISA, 1999). Eine Vektorfunktion ist bislang nur für Zecken bekannt. Die EGA tritt meist in geographisch klar abgegrenzten Gebieten auf und korreliert mit dem Vorkommen bestimmter Zeckenarten. Die meisten Fälle treten je nach Klimazone in Jahreszeiten auf, in der die Aktivität der adulten Zecken am höchsten ist (REUBEL et al., 1998; BARLOUGH et al., 1997).

*Ixodes pacificus* in Kalifornien (BROUQUI et al., 1995; SUMPTION et al., 1995) und *Ixodes scapularis* im Mittleren Westen und Osten (JOHANNSON et al., 1995; MADIGAN et al., 1995; GREIG et al., 1996) sind Vektoren der EGA in den USA. Dies ist anhand von demographischen Studien (VREDEVOE et al., 1995; RICHTER et al., 1996; BARLOUGH et al., 1997), Infektionsversuchen (PANCHOLI et al., 1995; DES VIGNES und FISH, 1997) und dem *A. phagocytophilum*-Nachweis in Zecken mittels PCR (VREDEVOE et al., 1995) dokumentiert. Als möglicher Vektor der EGA in Europa gilt die Zeckenart *Ixodes ricinus* (TIMONEY et al., 1988, ALTSCHUL et al., 1990; BARLOUGH et al., 1997). HARTELT et al. (2004) wiesen bei 1,9 - 4.5% der Zeckenart *Ixodes ricinus* *A. phagocytophilum* mit der PCR nach.

Als Reservoir gelten Wildnager, Hirsche, Schafe, Rinder und Pferde (OGDEN et al., 1998). Die Krankheit wurde bisher, außer in den USA, auch in Israel (LEVI et al., 2006), Schweden (PRINGLE, 2004), Großbritannien (KORBUTIAK und SCHNEIDERS, 1994), Deutschland (FRIEDHOFF, 1982; GERHARDS et al., 1987; V. LOEWENICH et al., 2003), Schweiz (HERMANN et al., 1985; PUSTERLA et al., 1998), Frankreich (LEBLOND et al., 2005), Italien (LILLINI et al., 2006) und Spanien (AMUSATEGUI et al., 2006) nachgewiesen.

### **2.2.1.2.3 Nachweis**

Aufgrund der unspezifischen Symptomatik der EGA bietet die Klinik keine Basis für eine sichere Diagnosestellung. Bis zu Beginn der 90er Jahre war der Indirekte Immunfluoreszenztest die häufigste Methode in der Diagnostik der EGA (RIKIHISA et al., 1991). Heutzutage nehmen molekularbiologische Methoden, insbesondere die PCR, diese Rolle ein (PUSTERLA et al., 1998). Die PCR hat sich als das zuverlässigste Nachweisverfahren erwiesen (PUSTERLA et al., 2000). Als Probenmaterial für die PCR dienen Vollblutproben (ANDERSON et al., 1991; IQBAL et al., 1994).

Der Antikörper-Nachweis mit dem Immunfluoreszenztest wird aber dennoch oft ergänzend zur PCR zur indirekten Diagnostik eingesetzt. Nach 30 Tagen ist eine Wiederholungsuntersuchung erforderlich (PUSTERLA et al., 1997). Erwartungsgemäß liefert die Serologie jedoch negative Ergebnisse zu Beginn der Infektion (MASSUNG et al., 1998).

Die Untersuchung von angefärbten Blutaussstrichen (Giemsa oder Acridin-Orange) kann diagnostisch hilfreich sein (MASSUNG et al., 1998). AGUERO-ROSENFELD et al. (1996) und BAKKEN et al. (1996) berichten aber von einer eher geringen Nachweisempfindlichkeit in zahlreichen Fällen.

Die Kultivierung von *A. phagocytophilum* ist seit Beginn der 90er Jahre möglich. In der Routinediagnostik hat sich die Zellkulturmethode aber bislang nicht etabliert, da diese Technik zeitlich und technisch zu aufwendig ist (DAWSON et al., 1991; GOODMAN et al., 1996).

### **2.2.1.2.4 Therapie**

Zur Therapie der EGA wird die Anwendung von Oxytetracyclin oder Doxzyclin empfohlen (V.D. KOLK et al., 1993; MASSUNG et al., 1998; BREITSCHWERDT et al., 1998; PUSTERLA et al., 1998). Häufig tritt eine deutliche Besserung innerhalb von 12-24 Stunden nach Einsetzen der antibiotischen Behandlung ein und die klinischen Symptome klingen in der Regel innerhalb weniger Tage ab (MADIGAN und GRIBBLE et al., 1987; MASSUNG et al., 1998). Im Rahmen einer Therapie kann das Verschwinden

der klinischen Symptomatik aber auch einen Zeitraum von 24 Stunden bis sechs Monate in Anspruch nehmen (ARTURSSON et al., 1999).

MADIGAN und GRIBBLE (1987) empfehlen die intravenöse Gabe von 7mg/kg Körpergewicht Oxytetracyklin einmal täglich über einen Zeitraum von sieben Tagen.

Im Rahmen einer experimentellen Studie erwies sich die Verabreichung von 10mg/kg Körpergewicht Oxytetracyklin (intravenös) über fünf Tage ebenfalls als gut wirksam (PUSTERLA et al., 1998).

Durch eine *A. phagocytophilum*-Infektion können Pferde eine bis zu zwei Jahren anhaltende Immunität entwickeln (MADIGAN und GRIBBLE, 1987; BARLOUGH et al., 1995).

#### **2.2.1.2.5 *A. phagocytophilum*-Infektionen als Zoonose**

Geographische, serologische und molekulargenetische Untersuchungen bekräftigen die Meinung, daß von *A. phagocytophilum* eine Zoonosegefahr ausgeht (CHEN et al., 1994; JOHANSSON et al., 1995; GOODMAN et al., 1996; MASSUNG et al., 1998). Nach GREIG et al. (1996) ist für *A. phagocytophilum* eine Rolle als Zoonoseerreger gewiß, da es im Infektionsversuch gelingt, die Equine Granulozytäre Anaplasmosen durch Übertragung von Blut eines an Humaner Granulozytärer Anaplasmosen erkrankten Menschen hervorzurufen (MADIGAN et al., 1995; PUSTERLA et al., 2000).

### **2.2.1.3 Neorickettsiose bei Pferden**

#### **2.2.1.3.1 Klinik**

Die Equine Monozytäre Neorickettsiose (Syn. Potomac horse fever) wurde erstmals 1979 in der Nähe des Potomac Rivers im U.S. Bundesstaat Maryland diagnostiziert (KNOWLES et al., 1983). Charakteristisch für die Equine Monozytäre Neorickettsiose sind Fieber (38,9-41,7°C), Anorexie und Apathie (RIKIHISA und PERRY, 1985; GOETZ et al., 1991; MOTT et al., 1997). Die Inkubationszeit beträgt im Infektionsversuch 12-18 Tage (DUTTA et al., 1985). In den meisten Krankheitsfällen können zwei Fieberphasen beobachtet werden. Die erste Phase beginnt wenige Tage vor dem Auftreten klinischer Symptome, die Zweite setzt meist mit Beginn der klinischen Symptomatik ein (DUTTA et al., 1985). Im Verlauf der Krankheit können Unterhautödeme im Gliedmaßen- und Unterbauchbereich, Kolik, Durchfall, Hufrehe und Aborte auftreten (HOLLAND, 1990; MULVILLE, 1991; GOETZ et al., 1991). Das klinische Bild variiert sehr stark bezüglich Vorkommen und Ausprägungsgrad der oben genannten Symptome (GOETZ et al., 1991). Durchfälle sind in 50-60% der Krankheitsfälle feststellbar und beginnen meistens drei bis sechs Tage nach dem Auftreten erster klinischer Symptome. Die Durchfälle können bis zu zehn Tage andauern (WHITLOCK et al., 1984; PALMER et al., 1988; GOETZ et al., 1991).

DUTTA et al. (1998) beschreiben eine Letalitätsrate von 20-25% und THAKER et al. (1990) von 10-20%. Nach GOETZ et al. (1991) liegt die Letalitätsrate nicht therapierter Pferde bei 30% und die therapierter Pferde bei 7%.

#### **2.2.1.3.2 Epidemiologie**

Bisher konnte die Equine Monozytäre Neorickettsiose in mehr als 40 U.S. Bundesstaaten, in Kanada, Australien, Frankreich und den Niederlanden nachgewiesen werden (V.D. KOLK et al., 1991; RHABACH et al., 1993). In Deutschland wurden bislang keine *N. risticii*-Infektionen bei Pferden nachgewiesen.

Die experimentelle Infektion mit *N. risticii* ist auch für die Tierarten Hund, Katze, Rhesus-Affe und Maus dokumentiert, wobei die klinische Symptomatik bei Mäusen am stärksten ausgeprägt war (DAWSON et al., 1988; BISWAS et al., 1991). KAKOMA et al. (1994) beschrieben einen Fall einer natürlichen *N. risticii*-Infektion bei einem Hund. Diskutiert wird, daß die oben genannten Tierarten eine Bedeutung als Reservoir von *N. risticii*-Infektionen beim Pferd besitzen (BISWAS et al., 1991; KAKOMA et al., 1994).

Grundsätzlich sind Neorickettsien-Infektionen vektorabhängig (RIKIHISA, 1999). Vektoren der Equinen Monozytären Neorickettsiose sind allerdings bislang noch nicht sicher belegt (RIKIHISA, 1999; PUSTERLA et al., 2000). Höchstwahrscheinlich sind Trematoden-Cercarien in den „Entwicklungszyklus“ von *N. risticii* eingebunden und auch Vektoren der Equinen Monozytären Neorickettsiose (BARLOUGH et al., 1998; REUBEL et al., 1998; PUSTERLA et al. 2000; PUSTERLA et al., 2003). Dies beruht auf dem positiven *N. risticii*-Nachweis in Trematoden-Cercarien aus Wasserschnecken mit der PCR (BARLOUGH et al., 1998; REUBEL et al., 1998; PUSTERLA et al., 2000; PUSTERLA et al., 2003; COFFMANN et al., 2008), dem gehäuften Auftreten der Krankheit in der Nähe von Gewässern (REUBEL et al., 1998) und der Möglichkeit der fäco-oralen Infektion (DUTTA, 1998).

#### **2.2.1.3.3 Nachweis**

Zum indirekten Nachweis einer Infektion mit *N. risticii* bei Pferden kommen hauptsächlich der Indirekte Immunfluoreszenztest (DUTTA et al., 1985; RISTIC et al., 1986), der ELISA (DUTTA et al., 1998; PRETZMAN et al., 1987) und der Kompetitive ELISA (SHANKARAPPA et al., 1989) zur Anwendung. Die indirekten Nachweisverfahren geben zwei bis drei Wochen nach Infektionsbeginn aussagekräftige Ergebnisse (RISTIC et al., 1986; THAKER et al., 1990; BISWAS et al., 1991).

Zum direkten Nachweis von *N. risticii* eignen sich die PCR (BISWAS et al., 1991; MOTT et al., 1997; BARLOUGH et al., 1997), die Zellkulturmethode (DUTTA et al., 1985; MOTT et al., 1997) und die Inokulation von Probensuspension in Labortiere. Die PCR wird als das ideale Diagnostikum mit höchster Spezifität und Sensitivität angesehen

(THAKER et al., 1990; BISWAS et al., 1991; MOTT et al., 1997). Sie liefert schon in der Frühphase der Infektion ein zuverlässiges, schnell verfügbares Ergebnis.

Die Zellkulturmethode und die Inokulation in Labortiere sind zeitlich und technisch aufwendig. Da beide Methoden bis zu drei Wochen in Anspruch nehmen, kommen sie in der Routinediagnostik selten zur Anwendung (THAKER et al., 1990; MOTT et al., 1997).

#### **2.2.1.3.4 Therapie**

Das am häufigsten eingesetzte Chemotherapeutikum zur Therapie der Equinen Monozytären Neorickettsiose ist Oxytetracyclin (PALMER und FALKOW, 1986; V. D. KOLK et al., 1991) in einer Dosierung von z.B. 6,6mg/kg intravenös über sieben bis zehn Tage. PALMER et al. (1992) beschreiben für Erythromycin und Rifampin ebenfalls eine gute Wirksamkeit. GOETZ et al. (1991) empfiehlt zur Reheprophylaxe DMSO (intravenös), Heparin und Azepromazin zu verabreichen.

Die Impfung gegen die Equine Monozytäre Neorickettsiose ist umstritten. Für VEMULAPALLI et al. (1995), DUTTA et al. (1998) und MOTT (1997) sind die Impfergebnisse unbefriedigend. Sie sehen dies darin begründet, daß bei der Impfstoffzusammensetzung die Heterogenität der *N. risticii*-Stämme nicht ausreichend berücksichtigt wurde. ATWILL et al. (1996) bewerten die Impfung wegen des schlechten Kosten-/Nutzenverhältnisses als finanziell nicht gerechtfertigt.

#### **2.2.2 Lawsonia intracellularis bei Fohlen (Equine Proliferative Enteropathy)**

*Lawsonia intracellularis* wurde erstmals 1996 von WILLIAMS et al. als Ursache einer Proliferativen Enteropathie bei einem Fohlen identifiziert. Seitdem beschrieben mehrere Arbeitsgruppen dieses Krankheitsbild bei Fohlen (FRANK et al. 1998; BREES et al., 1999; WUERSCH et al., 2006; DAUVILLIER et al., 2006; FEARY et al., 2007; MC GURRIN et al., 2007; FRAZER, 2008).

Bei *L. intracellularis* handelt es sich um obligat intrazelluläre, stäbchenförmige Bakterien mit einer wellenförmig aussehenden Zellwand. Sie sind 1-2µm lang und ca. 0,4µm breit (WILLIAMS et al., 1996; COOPER et al., 1996; BREES et al., 1999).

Die Krankheit ist eine typische Jungtiererkrankung. In einer retrospektiven Studie von FRAZER (2008) über 57 Fälle waren die betroffenen Fohlen zwischen zwei und acht Monaten alt. Die Sterblichkeitsrate lag bei 61%. In Europa wurde die Equine Proliferative Enteropathie erstmalig 2006 von WUERSCH et al. diagnostiziert.

Das klinische Bild einer Infektion mit *L. intracellularis* beim Fohlen ist geprägt von wässrigem Durchfall, apathischem Verhalten, Anorexie, Gewichtsverlust und Ödemen. Neben Hypoproteinämie können auch eine Neutrophilie und eine Leukozytose festgestellt werden. (WILLIAMS et al., 1996; FRANK et al., 1998; BREES et al., 1999). Histologisch ist eine adenomatöse Hyperplasie des Kryptenepithels, insbesondere im Ileum, festzustellen (WILLIAMS et al., 1996; COOPER et al., 1996; BREES et al., 1999). Duodenum, Jejunum und Colon können ebenfalls betroffen sein. Die Inzidenz und mögliche Infektionsquellen sind noch unklar (WILLIAMS et al., 1996; COOPER et al., 1996; FRANK et al., 1998; BREES et al., 1999). FRAZER (2008) berichtet von einer durchschnittlichen Preisminderung von 68% bei Jährlingen, die diese Krankheit als Fohlen hatten.

Zum Nachweis werden die PCR (JONES et al., 1993; COOPER et al., 1996), der Immunfluoreszenztest (MC ORIST et al., 1987; WILLIAMS et al., 1996) und die histologische Untersuchung von spezifisch gefärbtem Biopsiematerial (WILLIAMS et al., 1996; COOPER et al., 1996) eingesetzt. Beim Erreger-Nachweis im Kot ist die intermittierende Ausscheidung zu berücksichtigen. Der histologische Nachweis in spezifisch gefärbtem Biopsiematerial gilt daher als sichere Nachweismethode.

Im Rahmen der serologischen Diagnostik kann ein Immunperoxidase Monolayer-Test (FRAZER, 2008; PUSTERLA et al., 2008) oder ein Immunfluoreszenztest zur Anwendung kommen (DAUVILLIER et al., 2006). DAUVILLIER et al. (2006) berichten von einem erkrankten Fohlen, bei dem ein paar Tage nach Auftreten der klinischen Symptomatik eine Serokonversion feststellbar war, die über einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten andauerte. Bei einem anderen erkrankten Fohlen konnte dagegen keine Serokonversion festgestellt werden.



DAUVILLIER et al. (2006) berichten von zwei Fohlen, die mit Erythromycin behandelt wurden, bei denen vier Tage nach Behandlungsbeginn *L. intracellularis* mit der PCR nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Daher erscheint dieses Antibiotikum zur Behandlung der Krankheit geeignet zu sein. Bei der Behandlung der zwei Fohlen kamen außerdem die Antibiotika Ceftiofur, Gentamycin und Trimethoprim/Sulfonamid zur Anwendung (DAUVILLIER et al., 2006). Beide Fohlen überlebten die Krankheit. MC GURRIN et al. (2007) berichten von drei mit Erythromycin behandelten Fohlen, die die Krankheit ebenfalls überlebten. Zwei andere Fohlen, die nicht antibiotisch behandelt wurden, mußten euthanasiert werden.

### **2.2.3 *Coxiella burnetii* bei Pferden**

Serologische Untersuchungen belegen eine natürliche Empfänglichkeit von Pferden für *Coxiella burnetii* (VEERARAGHAVAN und SUKUMARAN, 1953; WILLEBERG et al., 1980).

Die klinische Bedeutung kann zur Zeit nicht beurteilt werden, da zu dieser Fragestellung keine detaillierten Untersuchungen vorliegen. Epidemiologische Aspekte sind ebenfalls unklar.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Untersuchungen, Tiere, Gewinnung und Art des Probenmaterials**

Im Rahmen einer serologischen Übersichtsuntersuchung wurden Blutserumproben von 329 Pferden (197 Junghengste, 50 Warmbluthengste, 82 Vollblutstuten) mit dem ELISA auf Chlamydien-Antikörper untersucht. Die Pferde stammten aus Niedersachsen, Hessen, Baden-Württemberg und Bayern.

Weiterhin wurden von 95 hessischen Pferden (13 Hengste, 38 Wallache und 44 Stuten) Blutserum- und Nasentupferproben entnommen. Von den 44 Stuten wurden zusätzlich auch Zervixtupferproben entnommen. Die Blutserumproben wurden mit dem ELISA und die Tupferproben mit dem Capture-ELISA untersucht. Die tierspezifischen Daten bezüglich Geschlecht, Alter, Nutzung, Haltungsform und Betriebsgröße wurden in einem Fragebogen erfaßt.

Bei neun Hengsten wurde eine serologische Verlaufsuntersuchung mit dem ELISA durchgeführt. Bei den Hengsten handelte es sich um Vollbluthengste, die alle im Natursprung deckten. Über einen Zeitraum von fünf Monaten wurden den Hengsten im Abstand von vier Wochen Blutserumproben entnommen.

Mit der PCR wurde Sperma von 110 Hengsten auf Chlamydien untersucht. Bei den Hengsten handelte es sich um 54 Hengste, die im Natursprung, und um 56 Hengste, die in der künstlichen Besamung eingesetzt wurden.

Im Rahmen einer Verlaufsuntersuchung mit verschiedenen indirekten (KBR, ELISA) und direkten Untersuchungsmethoden (Capture-ELISA, PCR, Zellkulturmethode, Kultivierung im embryonierten Hühnerei) wurden 40 Pferden im Winter (sieben Hengste, 13 Wallache, 20 Stuten) Blutserum- und Nasentupferproben entnommen. Den Stuten wurden auch Zervixtupferproben entnommen. Diese Versuche wurden ein halbes Jahr später wiederholt. Zu diesem Zeitpunkt standen noch 37 der 40 Pferde zur Verfügung. Bei der Wiederholungsuntersuchung kamen der ELISA, der Capture-ELISA und die PCR zur Anwendung.

Die Blutproben wurden aus der Jugularvene (V. jugularis) nach vorheriger lokaler Desinfektion mit Braunoderm (Fa. Braun, Melsungen) entnommen. Nach Zentrifugation bei 3000 U/Min für die Dauer von fünf Minuten wurde das Blutserum abpipettiert und bis zur weiteren Untersuchung bei -20°C gelagert.

Die Nasentupferproben wurden mit sterilen Trockentupfern (Fa. Seroprax, Wesel) durch festes Streichen über die Nasenschleimhaut im Bereich des Überganges zur pigmentierten Haut der Nase entnommen und bis zur weiteren Untersuchung bei -20°C gelagert.

Die Zervixtupferproben wurden nach Reinigung und lokaler Desinfektion der Vulva mit Braunoderm (Fa. Braun, Melsungen) mit Einmal-Sekretentnahmetupfern (Fa. WDT, Garbsen) im Bereich der Zervix durch Streichen über die Schleimhaut entnommen und bis zur weiteren Untersuchung bei -20°C gelagert.

Die für die Zellkulturmethode und die Anzüchtung im embryonierten Hühnerei bestimmten Nasen- und Zervixtupferproben wurden ebenfalls wie oben beschrieben entnommen, aber unmittelbar nach Entnahme in Transportmedium (Saccharose-Phosphat-Lösung) verbracht und bei -70°C gelagert.

### **3.2 Indirekte Nachweismethoden**

#### **3.2.1 Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR)**

Die Untersuchung der Blutserumproben erfolgte mit einer kommerziell erhältlichen *Chlamydophila psittaci*-Komplementbindungsreaktion (Fa. Dade-Behring, Marburg) nach Angaben des Herstellers.

Der Test wurde unter Verwendung von *Chlamydophila psittaci*-Antigen (ORAR 09, Fa. Dade-Behring, Marburg) in der vorgeschriebenen Verdünnung von 1:5 und mit zwei Einheiten lyophilisiertem Meerschweinchen-Komplement (ORAY, Fa. Dade-Behring, Marburg) im Mikrotiterverfahren durchgeführt.

Die zuvor 30 Minuten bei 56°C inaktivierten Pferdeseren wurden in log<sub>2</sub>-Verdünnungsstufen ab einer Verdünnung von 1:5 titriert. Zu je 25µl der entsprechenden log<sub>2</sub>-Verdünnungsstufe wurden 25µl Antigen und 50µl Komplement zugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden 50µl hämolytisches System zugesetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Neben Positiv- und Negativ-Kontrollen wurden Serum-, Komplement- und Antigen-Kontrollen mitgeführt. Eine vollständige Hemmung der Hämolyse mit typischer Knopfbildung der Erythrozyten wurde als positiv gewertet.

### **3.2.2 Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)**

#### **3.2.2.1 Beschichtung der Mikrotiterplatten**

Der *Chlamydophila psittaci*-Stamm 1904, der im Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere in Gießen aus Untersuchungsmaterial eines Papageies isoliert wurde, diente zur Herstellung des Antigens. Die Anzüchtung erfolgte in Mc Coy-Zellen. Die Antigen-Präparation erfolgte nach einer von SCHMEER und KRAUSS (1982) beschriebenen Technik. Als Kontrolle kam eine BGM-Zell-Suspension (Fa. Flow, Meckenheim) zur Anwendung. Das Antigen wurde im Verhältnis 1:100 und die Kontrollsuspension (BGM-Zellen) im Verhältnis 1:30000 mit Coatingpuffer (TBS 1) verdünnt.

Die Reihen 1,2,5,6 der 96-Loch-Mikrotiterplatten (Fa. Greiner, Nürtingen) wurden mit dem Antigen (0,1ml/Vertiefung) und die Reihen 3,4,7,8 mit der Kontrollsuspension (0,1ml/Vertiefung) belegt. Danach wurden die Platten für 16 Stunden bei 4°C inkubiert und die Vertiefungen ausgeleert. Es folgte eine zweistündige Trocknung im Trockenraum bei 37°C. Die weitere Lagerung erfolgte bei 4°C.

### **3.2.2.2 Durchführung des ELISA**

Die zu untersuchenden Seren wurden im Verhältnis 1:100 verdünnt. Zur Verdünnung diente TBS 2-Puffer mit Zusatz von 2,6g Fischgelatine (Fa. Sigma, Taufkirchen) pro 100ml. In zweifachem Ansatz wurden 100µl der Serumverdünnung in die Vertiefungen (außer erste Vertikalreihe) eingebracht und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Vertiefungen der Platten ausgeleert und dreimal im Abstand von fünf Minuten mit Waschpuffer gewaschen.

Das peroxidasegekoppelte Kaninchen-Anti-Pferd-Konjugat (Fa. Sigma, Taufkirchen) wurde im Verhältnis 1:2000 mit TBS 2 unter Zusatz von 2,6g Fischgelatine pro 100 ml verdünnt. In jede Vertiefung, außer der ersten Vertikalreihe, wurden 100µl der Konjugatverdünnung eingebracht. Nach 45-minütiger Inkubation wurden die Platten ausgeleert und dreimal im Abstand von fünf Minuten mit Waschpuffer gewaschen.

Zu 10ml Substratpuffer wurden 3µl Perhydrol ( $H_2O_2$ ; Fa. Merck, Darmstadt) hinzugefügt und jede Vertiefung mit 100µl Substratlösung beschickt. Der Substratumsatz wurde mit einem Multiskan Mehrkanalphotometer (Fa. Flow, Meckenheim) bei einer Wellenlänge von 405nm gemessen. Die Netto-Extinktions-Werte der einzelnen Seren ergaben sich durch Subtraktion des arithmetischen Mittels der jeweiligen Negativ-Antigenkontrollen vom arithmetischen Mittel der beiden Testwerte mit Anpassung an den Standardwert der Positiv-Kontrolle (450 ELISA-Einheiten).

Die erste Vertikalreihe jeder Mikrotiterplatte diente als Blank-Reihe und enthielt nur Substrat. Die zweite Vertikalreihe enthielt die Positiv-Kontrolle, die dritte die Antigen-Konjugat-Substratkontrolle und die obere Hälfte der vierten Vertikalreihe die Negativ-Kontrolle.

### **3.2.2.3 Bestimmung des Grenzwertes ("Cut off")**

Proben mit einer Netto-Extinktion größer als 150 ELISA-Einheiten wurden als positiv gewertet. Dieser Grenzwert ergab sich durch die Addition der dreifachen Standardabweichung zum Mittelwert 30 untersuchter negativer Blutserumproben. Proben, deren Netto-Extinktion oberhalb dieses Grenzwertes lagen, wurden als positiv gewertet.

### **3.3 Direkte Nachweismethoden**

#### **3.3.1 Capture-Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (Capture-ELISA)**

##### **3.3.1.1 Vorbereitung der Nasen- und Zervixtupferproben**

Zur Untersuchung der Nasen- und Zervixtupferproben wurde die Watte mit dem Probenmaterial von dem Holzstab abgezogen, um unspezifische Reaktionen durch Substanzen im Watteträger zu vermeiden. Die Watte wurde mit 1ml Waschpuffer und 20µl Proteinase K (Fa. Boehringer, Mannheim) versetzt. Zur Freisetzung der Chlamydien aus den Zellen folgte eine 30-minütige Inkubation bei 56°C. Um die Proteinase K anschließend zu inaktivieren, wurden die Proben für 15 Minuten auf 100°C erhitzt. Zur Durchführung des Capture-ELISA wurden von jeder Probe 300µl Probensuspension eingesetzt.

##### **3.3.1.2 Durchführung**

Als Fangantikörper diente der monoklonale Antikörper MAK 22, der im Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Veterinärmedizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität Gießen in einer Hybridomzelllinie produziert, aufbereitet und in lyophilisiertem Zustand gelagert wurde (KARO, 1991).

MAK 22 wurde in Coatingpuffer verdünnt (1:2000) und 100µl in jede Vertiefung der 96-Loch-Mikrotiterplatten (Fa. Greiner, Nürtingen), mit Ausnahme der ersten Vertikalreihe, pipettiert. Es folgte eine Inkubationsphase für 18 Stunden bei 4°C. Dann wurden die Mikrotiterplatten ausgeleert und pro Vertiefung 100µl Blockingpuffer zur Blockierung freier Bindungsstellen aufgetragen (15 Minuten bei Raumtemperatur). Anschließend wurden die Platten einmal mit Waschpuffer (200µl pro Vertiefung) gewaschen und ausgeleert. Von jeder aufbereiteten Probe wurden drei Vertiefungen mit je 100µl beschickt. Die Vertikalreihen eins und zwölf sowie die ersten beiden Horizontalreihen wurden nicht belegt. Die Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und danach dreimal mit Waschpuffer (200µl pro Vertiefung) gewaschen und ausgeleert.

Die Verdünnung des biotinylierten Nachweisantikörpers, ebenfalls MAK 22, im Waschpuffer betrug 1:2000. Jede Vertiefung, außer Vertikalreihe eins, wurde mit 100 µl Nachweisantikörper belegt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer (200µl pro Vertiefung) gewaschen und ausgeleert. Das Konjugat Streptavidin POD (Fa. Boehringer, Mannheim) wurde im Verhältnis 1:12500 mit Waschpuffer verdünnt. Mit Ausnahme der ersten Vertikalreihe wurde jede Vertiefung mit 100µl dieser Verdünnung beschickt. Die Mikrotiterplatten wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dreimal mit Waschpuffer (200µl pro Vertiefung) gewaschen. Pro Vertiefung wurden 100µl TMB-Substrat aufgetragen. Nach einer 30-minütigen Inkubationsphase bei Raumtemperatur wurde die Substratreaktion mit 3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50µl pro Vertiefung; Fa. Merck, Darmstadt) abgestoppt. Abschließend wurde die optische Dichte mit einem Multiskan Mehrkanalphotometer (Fa. Flow., Meckenheim) bei einer Wellenlänge von 405nm gemessen.

Kontrollen:

Die erste Vertikalreihe der Mikrotiterplatten diene als „Blank-Reihe“ und wurde mit TMB-Substrat und Stopreagenz (3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) beschickt. Die letzte Vertikalreihe jeder Platte diene als Fangantikörper-Nachweisantikörper-Konjugat-Substrat-Kontrolle (FAK-NAK-K-S-Kontrolle). Die ersten beiden Horizontalreihen wurden von der zweiten bis zur elften Vertiefung in einer Verdünnungsreihe mit Kontroll-Antigen belegt. Die niedrigste Verdünnungsstufe betrug 1:5000 und die höchste 1:256000.

### **3.3.1.3 Bestimmung des Grenzwertes ("Cut off")**

Für jede Platte wurde von den Extinktionswerten der FAK-NAK-K-S-Kontrolle und den Werten der drei größten Verdünnungsstufen der Kontrollantigen-Verdünnungsreihen der Mittelwert gebildet. Dieser Mittelwert plus die dreifache Standardabweichung bildete den Grenzwert.

### **3.3.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

#### **3.3.2.1 Untersuchung von Pferdespermaproben**

##### **3.3.2.1.1 Vorbereitung**

Zur DNS-Extraktion wurden von jeder Spermaprobe 140µl mit dem QIAmp Viral RNA Mini Kit (Fa. Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufbereitet und bis zur Durchführung der PCR bei -20 °C gelagert.

##### **3.3.2.1.2 Durchführung**

Das PCR-Reaktionsgemisch (20µl) enthielt 12µl Aqua bidest., 1µl Reaktionspuffer (Fa. Perkin Elmer, Überlingen), 2,4µl MgCl<sub>2</sub> (3,0 mM; Fa. Perkin Elmer, Überlingen), 1,6µl dNTP-Mix (16,0 mM; Fa. Amersham Pharmacia Biotech, USA), 0,2µl Ampli-Taq-Polymerase (Fa. Perkin Elmer, Überlingen), je 0,4µl Primer 2A und 2B (POLLARD et al., 1989; FISCHER, 1995) und 2µl DNS-Probensuspension.

Nach einem vorgeschalteten Denaturierungsschritt für fünf Minuten bei 94 °C folgten 35 Amplifikationszyklen in einem programmierbaren Thermocycler (Fa. Perkin Elmer, Überlingen).

Verlauf der Amplifikationszyklen: 94 °C für 15 Sekunden zur Denaturierung der DNS-Doppelstränge in Einzelstränge, 55 °C für 15 Sekunden zur Primeranlagerung (Annealing) an die komplementären DNS-Sequenzen und 30 Sekunden bei 72 °C zur Verlängerung der Primer mittels Taq-Polymerase (Extension). Nach Beendigung der Amplifikationszyklen folgte ein Inkubationsschritt für zehn Minuten bei 72 °C zur Vervollständigung der DNS-Synthese. Bis zum weiteren Gebrauch wurden die Amplifikate bei 4 °C gelagert.



### **3.3.2.2 Untersuchung von Nasen- und Zervixtupferproben**

#### **3.3.2.2.1 Vorbereitung der Tupferproben**

Das Wattematerial einer Tupferprobe wurde mit 500µl Lysepuffer in je ein 2ml-Eppendorf-Tube (Fa. Eppendorf, Hamburg) gegeben und 30 Sekunden bei 12000 U/Min zentrifugiert. Um sämtliche Flüssigkeit aus dem Tupfer zu gewinnen, wurde der Watteteil in einer halb abgeschnittenen 1ml Pipettenspitze in einem zweiten Röhrchen nochmals zwei Minuten zentrifugiert. Die Probenflüssigkeiten wurden vereinigt und 15 Minuten bei 14000 U/Min zentrifugiert. Danach wurden die Pellets in je 50µl Lysepuffer aufgenommen und mit je 20µl 1%-iger Proteinase K (Fa. Boehringer, Mannheim) inkubiert (zwei Stunden bei 60°C und zur Inaktivierung des Enzymes für 15 Minuten bei 97°C). Die DNS-haltige Lösung wurde dann mit 0,6 Volumenteilen Isopropanol (Fa. Merck, Darmstadt) vermischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die gefällte DNS wurde durch Zentrifugation für zehn Minuten bei 12000 g gesammelt und das Pellet in 20µl PBS gelöst.

#### **3.3.2.2.2 Durchführung**

Von jeder Tupferprobe wurden 1µl der DNS-Probensuspension mit 13,3µl Aqua bidest., 2µl Reaktionspuffer (Fa. Perkin Elmer, Überlingen), 1,2µl MgCl<sub>2</sub> (3,0 mM; Fa. Perkin Elmer, Überlingen), 1,6µl dNTP-Mix (16,0 mM; Fa. Amersham Pharmacia Biotech, USA), je 0,4µl Primer 2A und 2B (POLLARD et al., 1989; FISCHER, 1995) und 0,1µl Ampli-Taq-Polymerase (Fa. Perkin Elmer, Überlingen) versetzt.

Es folgten 35 Amplifikationszyklen in einem programmierbaren Thermocycler (Fa. Perkin Elmer, Überlingen). Die Zyklen wurden folgendermaßen durchgeführt: 94°C für eine Minute zur Denaturierung der DNS-Doppelstränge in Einzelstränge, 55°C für eine Minute zur Primeranlagerung (Annealing) und 72°C für die Dauer von zwei Minuten zur Verlängerung der Primer mittels Taq-Polymerase. Im Anschluß an die Amplifikationszyklen erfolgte ein Inkubationsschritt von zehn Minuten bei 72°C zur Vervollständigung der DNS-Synthese. Bis zum weiteren Gebrauch wurden die Amplifikate bei 4°C gelagert.

### **3.3.2.3 Analytische Agarose-Gel-Elektrophorese**

Die Auswertung der Amplifikate erfolgte in 2%-igem ethidiumbromidgefärbtem Agarosegel. Hierzu wurde die Agarose (Fa. Appligene, Heidelberg) in TAE-Puffer kurz aufgekocht und während des Abkühlens Ethidiumbromid (0,5µl/ml) hinzugefügt. Das Gel wurde in eine Flachbrettapparatur (Fa. Biorad, München) gegossen. In diese wurden zuvor Kämme zur Erzeugung der Probenaschen eingesetzt. Nach Aushärtung des Geles wurde die Apparatur in die mit 1xTAE-Puffer befüllte Luftkammer überführt und die Kämme entfernt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung (0,8-1 V/M). Von jeder Probe wurden 10µl Amplifikat mit 2µl Bromphenolblau-Puffer versetzt und in eine Probenasche gefüllt. Der Bromphenolblau-Puffer (Fa. Sigma, Taufkirchen) diente dabei als Marker, um die Laufstrecke kontrollieren zu können. Die im Gel befindliche DNS mit interkaliertem Ethidiumbromid (Fa. Serva, Heidelberg) wurde durch UV-Licht (254nm) sichtbar gemacht und das Ergebnis fotografisch festgehalten. Zur Auswertung der DNS-Banden wurden neben den Proben auf jedem Gel zwei Negativ-Kontrollen und eine Positiv-Kontrolle mitgeführt. Die Negativ-Kontrolle bestand aus einem Pool fünf Chlamydien negativer Hengstsperrmaproben und die Positiv-Kontrolle aus einem Pool fünf Chlamydien positiver Hengstsperrmaproben. Eine 1Kb-ladder (Fa. Invitrogen, NL) diente als DNS-Längenstandard.

### **3.3.3 Kulturelle Untersuchungen**

#### **3.3.3.1 Versuch zur Kultivierung von Chlamydien aus Probenmaterialien unter Verwendung von Zellkulturen**

Als Zellkulturen dienten Buffalo-Green-Monkey (BGM)-Zellen (Fa. Flow, Meckenheim). Die BGM-Zellen wurden in Vierkantflaschen (Fa. Schott, Mainz) ausgesät. Nach Auswachsen eines Zellmonolayers nach fünf Tagen wurde das Wachstumsmedium ohne Antibiotika-Zusatz (WMOA) abgegossen und zweimal mit je 3ml Versenlösung

gewaschen. Es folgte eine zweiminütige Inkubation mit 3ml Versen-/Trypsinlösung. Nach Abgießen der Lösung wurde erneut mit gleicher Menge Versen-/Trypsinlösung für sechs bis acht Minuten inkubiert. Darauf wurde der sich ablösende Zellrasen mit Hilfe einer Pipette suspendiert und je 1ml der Zellsuspension in zwei neue Vierkantflaschen, die mit 25ml WMOA befüllt waren, ausgesät. 2ml der Zellsuspension wurden in 20ml WMOA einpipettiert und suspendiert. Die Polystyrol-Zellkulturröhrchen (Fa. Greiner, Nürtingen) mit eingelegten, autoklavierten, runden Deckgläsern (Durchmesser 12mm) wurden mit je 1ml dieser Zellsuspension befüllt. Die Vierkantflaschen und Zellkulturröhrchen wurden danach bei 37°C im Brutschrank (Fa. Memmert, Schwabach) gelagert. Diese Arbeitsschritte wurden im Abstand von fünf Tagen, entsprechend der Dauer einer Passage, wiederholt.

#### **3.3.3.1.1 Vorbereitung des Probenmaterials**

Die Nasen- und Zervixtupferproben wurden in 2ml Transport-Medium (Saccharose-Phosphat-Lösung) bei -70°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Nach Auftauen der Proben erfolgte eine Ultraschallbehandlung der Tupfer. Anschließend wurde die Probensuspension mit Filtern (Fa. Schleicher u. Schuell, Dassel) der Porengröße 1,2µm und 0,45µm filtriert, um andere bakterielle Kontaminationen zu reduzieren.

#### **3.3.3.1.2 Beimpfen der Zellkulturen, Anlegen von Passagen**

Pro Probe wurden drei Polystyrol-Zellkulturröhrchen mit 0,4ml Probensuspension beimpft und jedem Zellkulturröhrchen 1ml Wachstumsmedium (WM 10%) mit Cycloheximid (2ng/ml WM 10%; Fa. Serva, Heidelberg) hinzugefügt. Die Probensuspension wurde dann für 60 Minuten bei 3000g (Beckman-Kühlzentrifuge J2-21) auf den BGM-Zell-Monolayer aufzentrifugiert. Nach fünftägiger Inkubation bei 37°C erfolgte die erste Passage. Insgesamt wurden drei Passagen durchgeführt. Zu Beginn einer Passage wurde der Inhalt eines Zellkulturröhrchens nach Ultraschallbehandlung in gleichen Mengen auf drei neue Röhrchen verteilt. Nach Zugabe von je 1ml Wachstumsmedium 10% mit Cycloheximid (2ng/ml WM 10%) erfolgte eine 60-minütige

Zentrifugation bei 3000g und die fünftägige Inkubationsphase bei 37°C im Brutschrank. Das zweite Röhrchen wurde für weitere drei Tage bei 37°C inkubiert und bei -70°C eingefroren. Die Deckglaskultur des dritten Röhrchens wurde mit der Färbemethode nach Giménez angefärbt und unter dem Lichtmikroskop bei 400- und 1000-facher Vergrößerung ausgewertet.

### **3.3.3.1.3 Anfärbung der Deckglaskulturen mit der Methode nach Giménez**

Zur Fixierung des Zellrasens auf den Deckgläsern wurde dreimal für die Dauer von fünf Minuten Methanol (99%; Fa. Roth, Karlsruhe) auf die Deckglaskulturen aufgetragen und jeweils wieder abgesaugt. Nach Spülen mit Aqua dest. folgte der erste Färbeschritt mit Karbolfuchsin für die Dauer von sechs Minuten. Nach Absaugen des Farbstoffes und Spülen mit Aqua dest. wurde zweimal eine Minute mit Malachitgrün (Fa. Merck, Darmstadt) gefärbt. Die Deckgläser wurden nach erneutem Spülen aus den Zellkultur Röhrchen entnommen, luftgetrocknet und mit Eukitt (Fa. Mertens, Bonn) mit dem Zellrasen nach unten auf Objektträger aufgeklebt.

### **3.3.3.2 Versuch zur Kultivierung von Chlamydien unter Verwendung von embryonierten Hühnereiern**

#### **3.3.3.2.1 Vorbebrütung**

Die befruchteten SPF-Eier (Spezifisch Pathogen Frei, Fa. Lohmann, Cuxhaven) wurden sieben Tage bei 37°C in einem automatischen Wendebrüter (Fa. Schumacher, Lardenbach) vorbebrütet. Unbefruchtete Eier und solche, deren Embryo abgestorben war, wurden während der Vorbebrütungsphase aussortiert.

#### **3.3.3.2.2 Vorbereitung des Probenmaterials**

s. 3.3.3.1.1, Seite 31

### **3.3.3.2.3 Anzüchtung von Chlamydien aus klinischem Probenmaterial**

Nach der siebentägigen Vorbebrütungsphase wurden die Eier unter einer Reinraumwerkbank (Fa. Heraeus, Hanau) mit Probensuspension beimpft. Die Eier wurden zwei Stunden vor dem Beimpfen mit der Luftkammer nach oben senkrecht in den Brutschrank gestellt, um eine zentrale Stellung des Dottersackes für die vertikale Beimpfung zu erhalten. Nach vorheriger Jod-Alkohol-Desinfektion wurde mit einem „Ei-Pick“ das Inokulationsloch zentral in den oberen Pol gebohrt und danach erneut desinfiziert. Das Probenmaterial wurde dann mit einer Tuberkulinspritze mit aufgesetzter Kanüle zentral in den Dottersack injiziert. Die Kanüle wurde dazu in der Longitudinalachse des Eies in ihrer ganzen Länge eingestochen. Nach erneuter Desinfektion mit Jod-Alkohol-Lösung wurde das Loch mit Flüssigklebstoff verschlossen. Pro Passage wurden drei Eier mit je 0,4ml Probensuspension beimpft. Der Probensuspension wurden je Ei 500µg Gentamycin, 1000µg Streptomycin, 1000µg Vancomycin und 500µg Nystatin hinzugefügt. Nach dem Beimpfen wurden die Eier bei 37°C bebrütet und täglich mit einer Schierlampe kontrolliert. Von den Eiern, deren Embryo abgestorben war, wurde ein Objektträgerabstrich mit Dottersackmaterial angefertigt und dieser nach Hitze-fixierung mit der Methode nach Giménez (s. 3.4.3.2.4) angefärbt. Am zehnten Tag nach Beimpfung wurden die noch verbliebenen Eier ebenfalls nach oben beschriebener Vorgehensweise verarbeitet. Bei negativem Befund wurde das Dottersackmaterial mit SPG-Medium (Snyder I) und sterilem Meersand im Mörser homogenisiert und weitere Passagen wie oben beschrieben durchgeführt. Die Auswertung der mikroskopischen Präparate erfolgte bei 400- und 1000-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop.

### **3.3.3.2.4 Giménez-Färbung**

Nach Ausstreichen des Dottersackmaterials auf Objektträgern und anschließendem Hitze-fixieren folgte der erste Färbeschritt mit Karbolfuchsin für die Dauer von acht Minuten. Danach wurde das Karbolfuchsin mit Aqua dest. abgespült und die Abstriche zweimal für eine Minute mit Malachitgrün (Fa. Merck, Darmstadt) gefärbt. Nach Abspülen des Farbstoffes mit Aqua dest. wurden die Objektträger luftgetrocknet.

### **3.4. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Zur Anwendung kamen der Chi-Quadrat-Test, Exakter Test nach Fisher und die Logistische Regression.

In der vorliegenden Arbeit verwendete Signifikanzschwellen waren hoch signifikant ( $p < 0,001$ ), signifikant ( $0,001 < p \leq 0,01$ ), schwach signifikant ( $0,01 < p \leq 0,05$ ) und nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

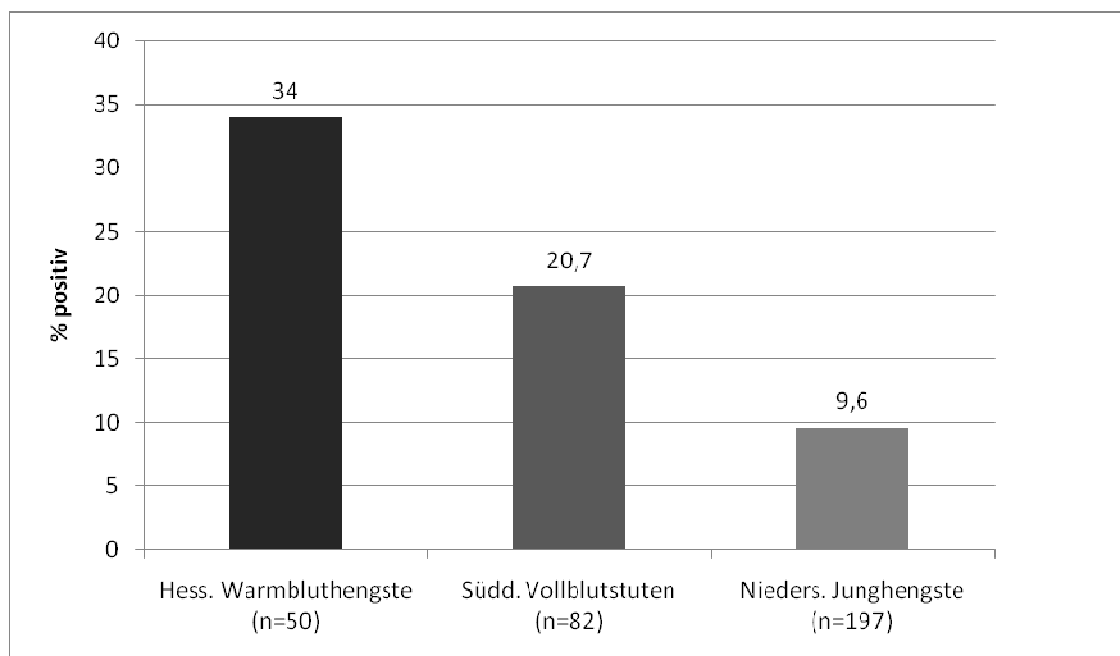
## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Nachweis von Antikörpern gegen Chlamydien bei verschiedenen Pferderassen unterschiedlichen Alters**

Von den 329 Blutserumproben (von 197 Junghengsten, 82 Vollblutstuten und 50 Warmbluthengsten) reagierten 53 (16,1%) serologisch positiv.

Die Seroprävalenz war bei den hessischen Warmbluthengsten am höchsten mit 34% (s. Abb. 1). Bei den Vollblutstuten lag sie bei 20,7% und bei den Junghengsten war sie mit 9,6% am niedrigsten.

In der Altersklasse <4 Jahre lag die Seroprävalenz bei 10,3% und in der Altersklasse 4-7 Jahre bei 11,1%. Deutlich höher war die Nachweisrate bei den älteren Pferden. Von den 8-13-jährigen Pferden waren 31,9% und in der Altersklasse >13 Jahre 37,5% serologisch positiv (s. Abb. 2). Die Unterschiede zu den  $\leq 7$ -jährigen Pferden erwiesen sich aber als nicht signifikant.



**Abbildung 1: Seroprävalenzraten von Chlamydien (ELISA) bei niedersächsischen Junghengsten (n=197), süddeutschen Vollblutstuten (n=82) und hessischen Warmblutdeckhengsten (n=50)**

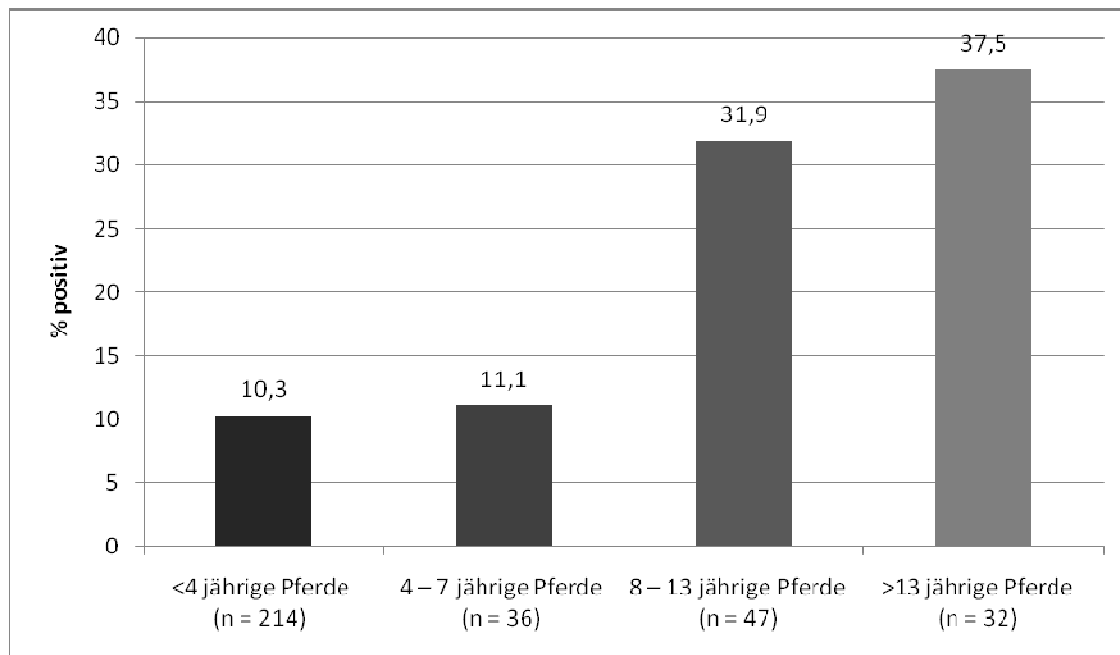


Abbildung 2: Chlamydien-Seroprävalenzraten (ELISA) bei Pferden (n=329) unterschiedlichen Alters

#### **4.2 Nachweis von Chlamydien-Antikörpern mit dem ELISA und Chlamydien-Antigen mit dem Capture-ELISA bei 95 hessischen Großpferden**

Blutserumproben von 95 hessischen Großpferden wurden mit ELISA auf das Vorkommen von Chlamydien-Antikörpern und Nasentupferproben dieser Pferde mit dem Capture-ELISA auf Chlamydien-Antigen untersucht. Ziel dieser Untersuchung war, festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Chlamydien-Antigen bzw. dem Antikörper-Nachweis und dem Geschlecht, Alter, Nutzung, Haltungsform der Pferde und der Betriebsgröße gibt.

Insgesamt:

Dreizehn der 95 Pferde (13,7%) waren im ELISA serologisch positiv. Deutlich häufiger konnte dagegen Chlamydien-Antigen mit dem Capture-ELISA in den Tupferproben der Pferde nachgewiesen werden (Nasentupferproben 40% und Zervixtupferproben 29,5%). Von den 95 Pferden waren vier Pferde sowohl serologisch als auch im Antigen-Nachweis positiv.

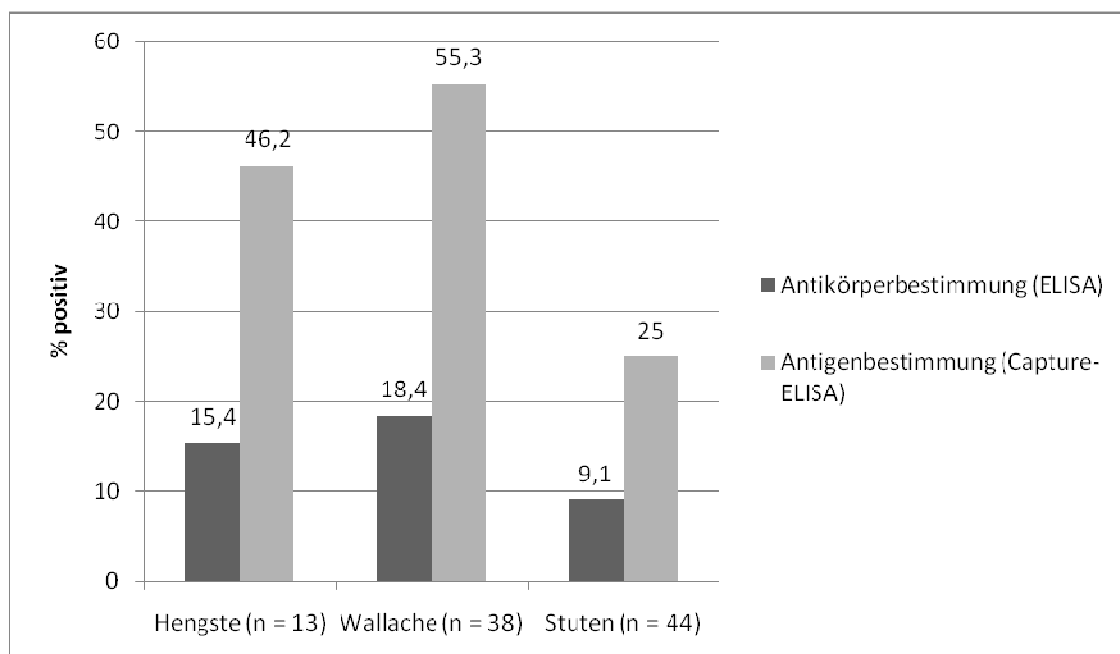


Bei Pferden in zehn der 19 Betriebe (52,6%) wurden Antikörper gegen Chlamydien nachgewiesen. Chlamydien-Antigen wurde dagegen in Nasentupferproben von Pferden aus 17 der 19 Betriebe (89,4%) nachgewiesen. Im Folgenden werden die Untersuchungsergebnisse der direkten und indirekten Diagnostik im Hinblick auf die vorher aufgeführten Parameter analysiert.

#### **4.2.1 Einfluß des Geschlechtes auf die Häufigkeit positiver Befunde im Rahmen der Chlamydiendiagnostik**

Wie aus Abb. 3 ersichtlich, lag die Seroprävalenz bei den Wallachen mit 18,4% am höchsten. In der Gruppe der Hengste waren 15,4% und bei den Stuten 9,1% serologisch positiv. Der Erreger-Nachweis gelang dagegen häufiger als der Antikörper-Nachweis. Bei 55,3% der Wallache, 46,2% der Hengste und 25% der Stuten lag ein positives Ergebnis des Capture-ELISA vor.

Eine geschlechtsspezifische, statistisch gesicherte Häufung positiver Befunde war nicht nachweisbar.



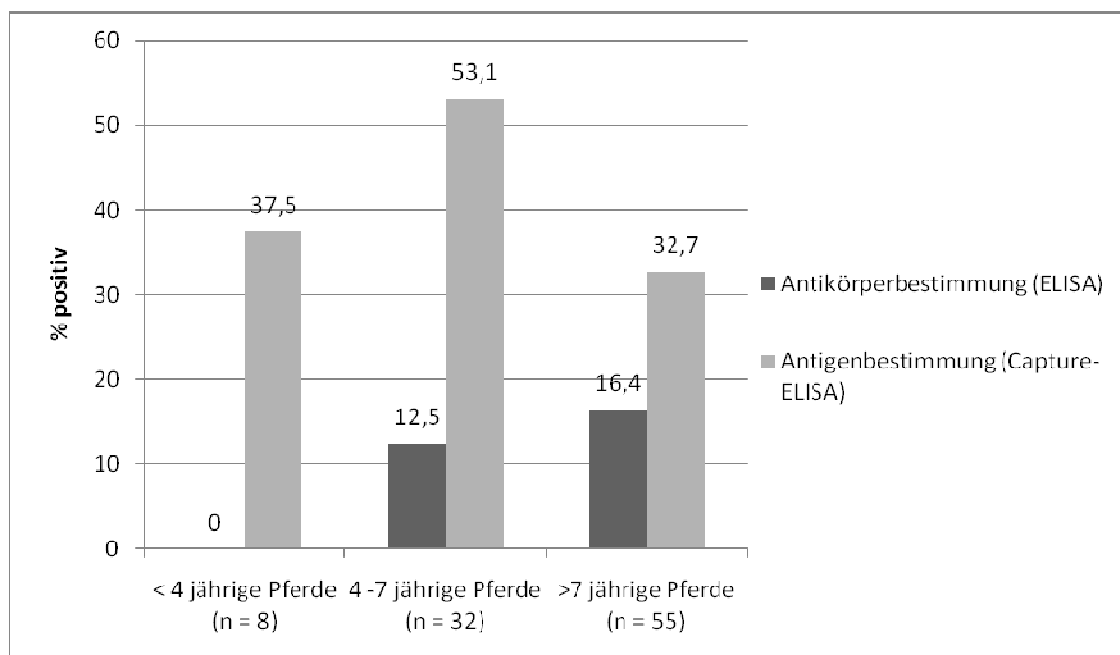
**Abbildung 3: Ergebnisse der direkten (Capture-ELISA) und indirekten (ELISA) Chlamydiendiagnostik bei hessischen Pferden (n=95) unterschiedlichen Geschlechtes**

#### **4.2.2 Einfluß des Alters auf die Häufigkeit positiver Befunde im Rahmen der Chlamydiendiagnostik**

Die 95 Pferde wurden in verschiedene Altersgruppen (Gruppe 1: <4-jährige, Gruppe 2: 4-7-jährige und Gruppe 3: >7-jährige Pferde) eingeteilt (Abb. 4).

In der Jungpferdegruppe (Gruppe 1) war kein Tier serologisch positiv. Bei drei dieser serologisch negativen Pferde wurde aber Chlamydien-Antigen in den Nasentupferproben mit dem Capture-ELISA nachgewiesen. In Gruppe 2 und 3 betrug die Seroprävalenz 12,5% bzw. 16,4%. In Gruppe 2 (4-7-jährige Pferde) wurde Chlamydien-Antigen mit dem Capture-ELISA bei 53,1% der Pferde und in Gruppe 3 (>7-jährige Pferde) bei 32,7% der Pferde nachgewiesen.

Ein statistisch gesicherter Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Chlamydien-Antigen und Chlamydien-Antikörpern und dem Alter der Pferde gab es nicht.



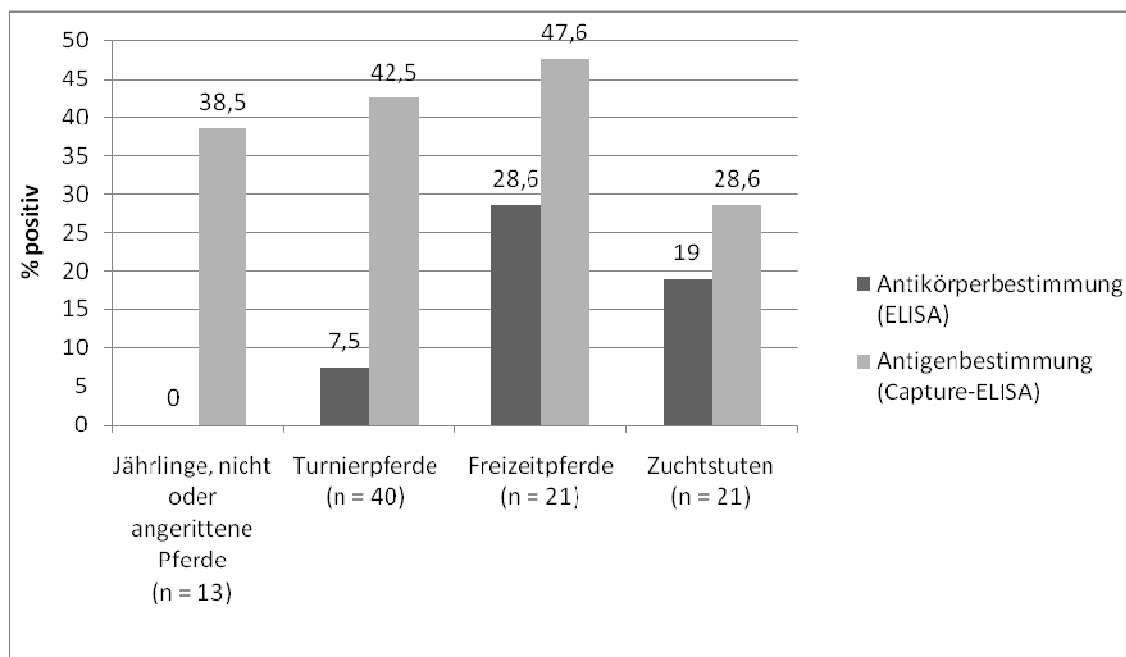
**Abbildung 4:** Ergebnisse der direkten (Capture-ELISA) und indirekten (ELISA) Chlamydiendiagnostik bei hessischen Pferden (n=95) unterschiedlichen Alters

#### **4.2.3 Einfluß der Nutzung auf die Häufigkeit positiver Befunde im Rahmen der Chlamydiendiagnostik**

Die 95 Pferde wurden bezüglich ihrer Verwendung in vier Gruppen eingeteilt. Zur Gruppe 1 gehörten 13 Jährlinge und Pferde, die noch nicht oder aber angeritten waren. Die Gruppe der Turnierpferde (Gruppe 2) setzte sich aus 40 Pferden und die Gruppe der Freizeitpferde (Gruppe 3) aus 21 Pferden zusammen. Die Gruppe 4 wurde von 21 Zuchtstuten gebildet.

In der Gruppe 1 reagierte kein Pferd serologisch positiv. Im Gegensatz zur serologischen Untersuchung konnten bei 38,5% dieser Pferde mit dem Capture-ELISA Chlamydien-Antigen nachgewiesen werden. Die meisten positiv getesteten Pferde stammten aus der Gruppe der Freizeitpferde. 28,6% der Freizeitpferde waren serologisch positiv und bei 47,6% dieser Pferde wurde Chlamydien-Antigen nachgewiesen (s. Abb. 5).

Ein statistisch gesicherter Zusammenhang zwischen dem Chlamydien-Nachweis und der Nutzung der Pferde war aber nicht feststellbar.



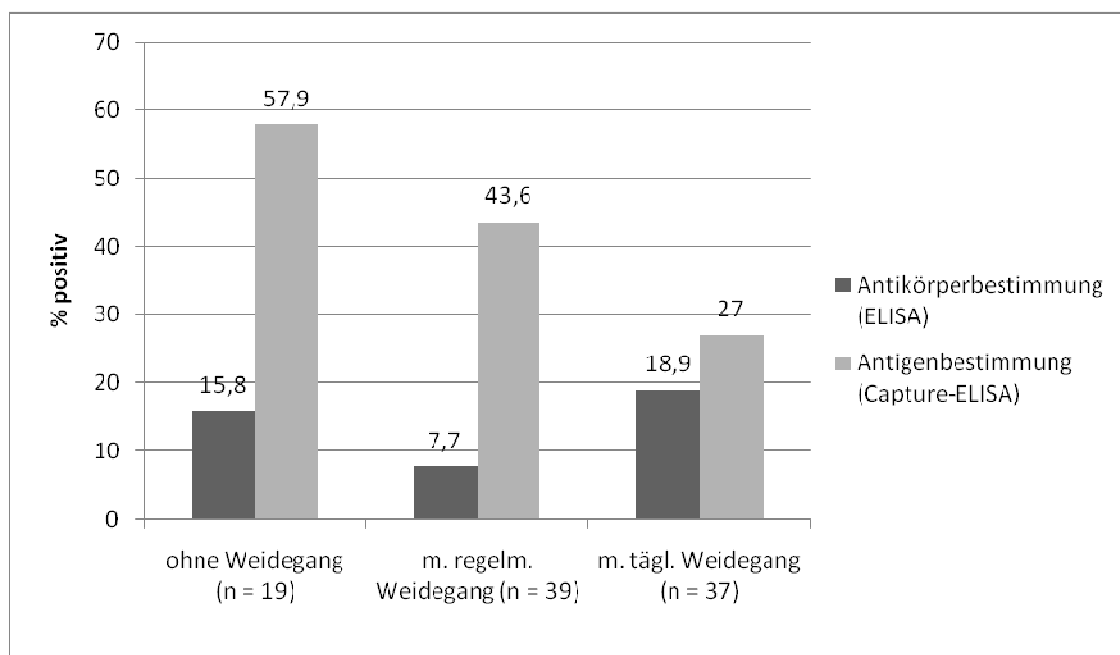
**Abbildung 5: Ergebnisse der direkten (Capture-ELISA) und indirekten (ELISA) Chlamydiendiagnostik bei hessischen Pferden (n=95) unterschiedlicher Nutzung**

#### **4.2.4 Einfluß der Haltungsform auf die Häufigkeit positiver Befunde im Rahmen der Chlamydiendiagnostik**

Die Gruppe 1 bildeten 19 in Boxen gehaltene Pferde ohne Weidegang. Die zweite Gruppe bestand aus 39 in Boxen gehaltenen Pferden mit regelmäßigem Weidegang (2-4x pro Woche) während der Weidesaison. Gruppe 3 waren 37 Pferde mit täglichem Weidegang während der Weidesaison.

In der Gruppe der in Boxen gehaltenen Pferde mit täglichem Weidegang von Mai-September (Gruppe 3) war die Seroprävalenz mit 18,9% am höchsten (s. Abb. 6). Dagegen wurde mit dem Capture-ELISA Chlamydien-Antigen am häufigsten in Gruppe 1, bei den Pferden ohne Weidegang, nachgewiesen (57,9%).

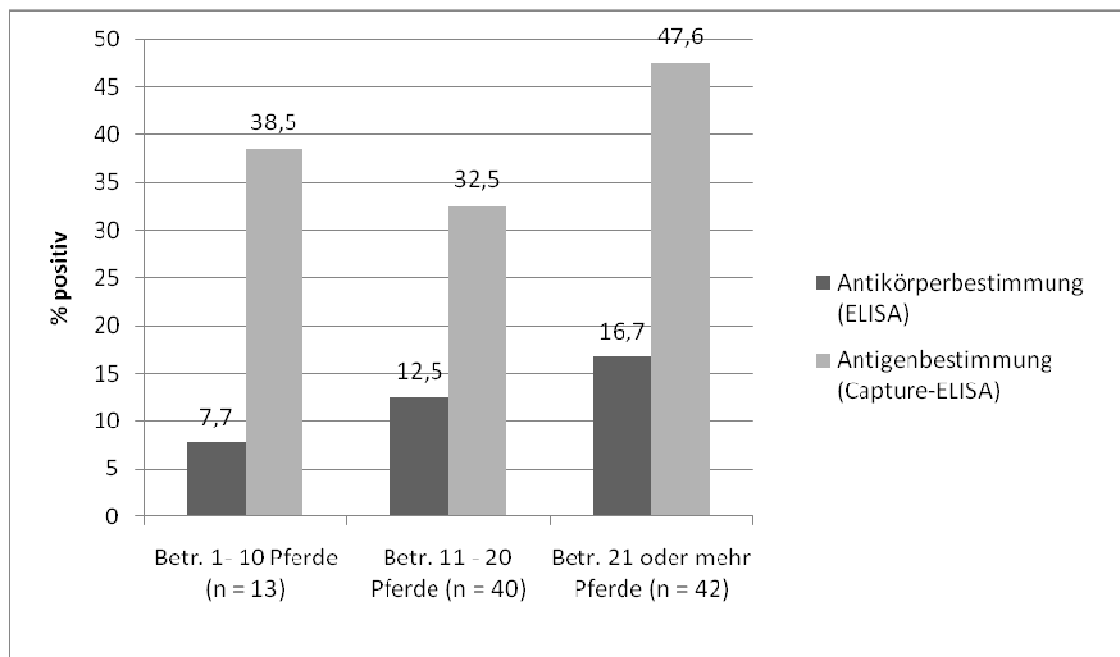
Ein statistisch gesicherter Zusammenhang zwischen dem Antigen-/Antikörper-Nachweis und der Haltungsform der Pferde konnte nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 6: Ergebnisse der direkten (Capture-ELISA) und indirekten (ELISA) Chlamydiendiagnostik bei hessischen Pferden (n=95) in Abhängigkeit von der Haltungsform**

#### **4.2.5 Einfluß der Betriebsgröße auf die Häufigkeit positiver Befunde im Rahmen der Chlamydiendiagnostik**

In den größeren Betrieben wurden Chlamydien-Infektionen häufiger nachgewiesen (Seroprävalenz 16,7% und Antigen-Nachweis bei 47,6% der Pferde). Ein statistisch gesicherter Zusammenhang zwischen Chlamydien-Nachweis (Antigen und Antikörper) und der Betriebsgröße konnte aber nicht belegt werden.



**Abbildung 7: Ergebnisse der direkten (Capture-ELISA) und indirekten (ELISA) Chlamydiendiagnostik bei hessischen Pferden (n=95) unterschiedlicher Betriebsgröße**

### **4.3 Serologische Verlaufsuntersuchung auf Chlamydien bei Vollblutdeckhengsten (n=9)**

Von den neun in die Untersuchung einbezogenen Deckhengste waren sieben mindestens einmal bei den in monatlichen Intervallen durchgeführten Untersuchungen serologisch im Chlamydien-ELISA positiv (Tab. 2).

Sieben der insgesamt untersuchten Proben (n=45) waren seropositiv (15,6%) und zwar bei fünf Hengsten jeweils eine und bei einem Hengst zwei der Proben. Bei den Hengsten mit positivem Ergebnis wies die Folgeuntersuchung im nächsten Monat bei keinem der Hengste ein positives Ergebnis auf.

**Tabelle 2: Serologische Verlaufsuntersuchung bei Vollbluthengsten (n=9) im ELISA (Antikörper-Nachweis) in monatlichen Intervallen**

<b>Hengste</b>	<b>Monat der Probenentnahme</b>				
	November	Dezember	Januar	Februar	März
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-
4	+	-	+	-	-
5	-	-	-	-	+
6	-	-	+	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	+	-	-	-
9	-	+	-	-	-
+ = ELISA positiv - = ELISA negativ					

#### **4.4 Nachweis Chlamydien spezifischer Gensequenzen mit der PCR in Pferdespermaproben von deutschen Deck- und Besamungshengsten**

Von den insgesamt untersuchten Spermaproben von 56 Natursprunghengsten waren vier Proben (7,1%) in der PCR Chlamydien positiv.

Dagegen wurden bei keiner der 54 in der künstlichen Besamung eingesetzten Hengste Chlamydien-DNS mittels PCR nachgewiesen. Der Unterschied erwies sich im  $\chi^2$ -Test als signifikant.

#### **4.5 Verlaufsuntersuchung mit verschiedenen indirekten und direkten Nachweismethoden**

Im Rahmen einer Verlaufsuntersuchung wurde Probenmaterial von Pferden im Abstand von sechs Monaten mittels serologischer Verfahren (ELISA, KBR) und durch Erreger- bzw. Genom-Nachweis auf das Vorliegen einer Chlamydien-Infektion untersucht.

##### **4.5.1 Ergebnisse der serologischen Verlaufsuntersuchung**

Hier wurden die Seroprävalenzen der Erstuntersuchung und der Wiederholungsuntersuchung nach sechs Monaten verglichen.

Bei der Erstuntersuchung lag die Nachweisrate mit der KBR bei 5% und mit ELISA bei 17,5%. Die Serumprobe von einem Pferd war in beiden Testsystemen serologisch positiv. Bei 32 Pferdesera lieferten beide Untersuchungsmethoden ein negatives Ergebnis. Damit ergab die Erstuntersuchung bei 82,5% der Pferde ein übereinstimmendes Ergebnis. Anzumerken ist aber, daß bei Blutserumproben von sechs Pferden der ELISA ein positives Ergebnis und die KBR aber ein negatives Ergebnis erbrachte. Die Probe von einem Pferd war dagegen mit der KBR Chlamydien-Antikörper positiv, aber mit dem ELISA negativ.

Bei der Wiederholungsuntersuchung, bei dem nur der ELISA zur Anwendung kam, waren weniger Serumproben (8,1%) mit dem ELISA serologisch positiv als bei der Erstuntersuchung (17,5%).

Mit dem ELISA konnten bei der Erstuntersuchung in Blutserumproben von Pferden aus fünf der acht Betriebe (62,5%) Chlamydien-Antikörper nachgewiesen werden und bei der Wiederholungsuntersuchung war dies nur noch in Serumproben von Pferden aus drei der acht Betriebe (37,5%) der Fall. Bei einem Pferd wurden Chlamydien-Antikörper sowohl bei der Erstuntersuchung als auch bei der Wiederholungsuntersuchung mit beiden Methoden nachgewiesen.

#### **4.5.2 Ergebnisse der Verlaufsuntersuchung unter Verwendung direkter Nachweismethoden (PCR, Capture-ELISA, Zellkulturmethode und Kultivierungsmethode in embryonierten Hühnereiern)**

Zuerst werden die Ergebnisse der Erstuntersuchung der Nasen- und Zervixtupferproben mit der PCR und dem Capture-ELISA, einer älteren Methode, verglichen.

Mit der PCR wurden bei der Erstuntersuchung in sechs von 40 (15%) Nasentupferproben Chlamydien nachgewiesen. Im Capture-ELISA waren 15 der 40 Nasentupferproben (37,5%) positiv. Die Erstuntersuchung erbrachte bei der Untersuchung der Nasentupferproben von vier Pferden (10%) nur die PCR ein positives Ergebnis. Nasentupferproben von dreizehn Pferden (32,5%) waren dagegen nur mit dem Capture-ELISA Chlamydien-Antigen positiv. Insgesamt lieferten die Untersuchungen der Nasentupferproben mit der PCR und dem Capture-ELISA nur bei 23 Pferden (57,5%) ein übereinstimmendes Ergebnis.

Bei der Erstuntersuchung der Zervixtupferproben waren, im Gegensatz zu den Nasentupferproben, deutlich mehr Proben mit der PCR (55%) positiv als mit dem Capture-ELISA (25%). Zervixtupferproben von acht der 20 Pferde (40%) reagierten nur in der PCR positiv. Drei der 20 Pferde (15%) waren sowohl mit der PCR und dem Capture-ELISA Chlamydien-Antigen positiv. Demgegenüber war eine Probe (5%) im Capture-ELISA positiv und in der PCR negativ. Der Mc Nemar-Test ergab einen signifikanten Unterschied bezüglich der Übereinstimmung der Ergebnisse von Capture-ELISA und PCR.

Weder mit der Zellkulturmethode noch mit der Kultivierungsmethode durch Inokulation von Probensuspension in den Dottersack embryonierter Hühnereier konnten aus den 40



Nasentupferproben und 20 Zervixtupferproben der 40 klinisch gesunden Pferde, trotz dreimaliger Anzüchtungspassage, Chlamydien angezüchtet werden.

Bei der Wiederholungsuntersuchung nach sechs Monaten mit der PCR und dem Capture-ELISA gelang der Chlamydien-Nachweis im Vergleich zur Erstuntersuchung deutlich seltener. Mit der PCR waren zwei der 37 (5,4%) Nasentupferproben und mit dem Capture-ELISA eine Nasentupferprobe (2,7%) Chlamydien-Antigen positiv.

Bei der Wiederholungsuntersuchung gab es bezüglich der Untersuchung der Nasentupferproben mit der PCR und dem Capture-ELISA eine größere Übereinstimmung der Ergebnisse (91,8%). Zwei der Nasentupferproben waren nur in der PCR positiv. Eine Nasentupferprobe lediglich mit dem Capture-ELISA.

Bei der Wiederholungsuntersuchung der Zervixtupferproben wurden nur noch bei einer der 19 (5,2%) Zervixtupferproben sowohl mit der PCR als auch mit dem Capture-ELISA Chlamydien nachgewiesen. Bei den restlichen Proben erbrachten beide Methoden ein negatives Ergebnis.

#### **4.5.3 Zusammenfassende Darlegung der Befunde zum Antikörper- und Erreger-Nachweis im Rahmen der Verlaufsuntersuchung**

Bei der Erstuntersuchung gab es sowohl seropositive Pferde, bei denen keine Chlamydien in den Nasen- und Zervixtupferproben nachgewiesen wurden, als auch seronegative Pferde, bei denen Chlamydien in den Tupferproben nachgewiesen werden konnten.

Bei drei der sieben mit ELISA seropositiv getesteten Pferde (42,8%) wurden bei der Erstuntersuchung weder mit dem Capture-ELISA noch mit der PCR Chlamydien nachgewiesen. Demgegenüber steht eine größere Anzahl von elf seronegativen Pferden, bei denen Chlamydien mit der PCR nachgewiesen wurden (bei vier dieser Pferde war sowohl die Nasen- als auch die Zervixtupferprobe positiv, bei einem nur die Nasentupferprobe und bei sechs Pferden nur die Zervixtupferprobe.) Der Capture-ELISA erbrachte bei 15 seronegativen Pferden ein positives Ergebnis.

Bei der Wiederholungsuntersuchung konnten bei den drei seropositiven Pferden keine Chlamydien in den Nasen und Zervixtupferproben nachgewiesen werden.

**Tabelle 3: Gegenüberstellung indirekter und direkter Verfahren zur Chlamydien-Diagnostik am Beispiel der Untersuchung von 40 Pferden unterschiedlichen Geschlechtes (Erstuntersuchung)**

n=40	Ergebnis bei verschiedenen Untersuchungsmethoden			
	Antikörper - Nachweis		Antigen - Nachweis	
Pferd Nr.	KBR	ELISA	C.-ELISA	PCR
1	+	+	+N	+N
2	+	-	+Z	+Z
3	-	+	+Z	-
4	-	+	+N	-
5	-	+	-	-
6	-	+	-	-
7	-	+	-	-
8	-	+	-	-
9	-	-	+N	+N,Z
10	-	-	+Z	+N,Z
11	-	-	+Z	+N
12	-	-	+N	+Z
13	-	-	+N	+Z
14	-	-	-	+N,Z
15	-	-	-	+N,Z
16	-	-	-	+Z
17	-	-	-	+Z
18	-	-	-	+Z
19	-	-	-	+Z
20	-	-	+N	-
21	-	-	+N	-
22	-	-	+N	-
23	-	-	+N	-
24	-	-	+N	-
25	-	-	+N	-
26	-	-	+N	-
27	-	-	+N	-
28	-	-	+N	-
29	-	-	-	-
30	-	-	-	-

Fortsetzung von Tab. 3				
n=40	Ergebnis bei verschiedenen Untersuchungsmethoden			
	Antikörper - Nachweis		Antigen - Nachweis	
Pferd Nr.	KBR	ELISA	C.-ELISA	PCR
31	-	-	-	-
32	-	-	-	-
33	-	-	-	-
34	-	-	-	-
35	-	-	-	-
36	-	-	-	-
37	-	-	-	-
38	-	-	-	-
39	-	-	-	-
40	-	-	-	-
+ = positiver Chlamydien-Antikörper-Nachweis +N = positiver Chlamydien-Nachweis in der Nasentupferprobe +Z = positiver Chlamydien-Nachweis in der Zervixtupferprobe				

**Tabelle 4: Gegenüberstellung indirekter und direkter Verfahren zur Chlamydien-Diagnostik am Beispiel der Untersuchung von 37 Pferden unterschiedlichen Geschlechtes (Wiederholungsuntersuchung nach sechs Monaten)**

n=40	Ergebnis bei verschiedenen Untersuchungsmethoden		
	Antikörper - Nachweis	Antigen - Nachweis	
Pferd Nr.	ELISA	C.-ELISA	PCR
1	+	-	+N
2	+	-	-
3	+	-	-
4	-	+Z	+Z
5	-	-	+N
6	-	-	+N
7	-	-	+Z
8	-	+N	-
9	-	-	-
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-

Fortsetzung von Tab. 4			
n=40	Ergebnis bei verschiedenen Untersuchungsmethoden		
	Antikörper - Nachweis	Antigen - Nachweis	
Pferd Nr.	ELISA	C.-ELISA	PCR
14	-	-	-
15	-	-	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	-	-	-
19	-	-	-
20	-	-	-
21	-	-	-
22	-	-	-
23	-	-	-
24	-	-	-
25	-	-	-
26	-	-	-
27	-	-	-
28	-	-	-
29	-	-	-
30	-	-	-
31	-	-	-
32	-	-	-
33	-	-	-
34	-	-	-
35	-	-	-
36	-	-	-
37	-	-	-
38			
39			
40			
+ = positiver Chlamydien-Antikörper-Nachweis +N = positiver Chlamydien-Nachweis in der Nasentupferprobe +Z = positiver Chlamydien-Nachweis in der Zervixtupferprobe Pferde 38, 39 und 40 standen für die Wiederholungsuntersuchung nicht mehr zur Verfügung			

## **5. Diskussion der Ergebnisse**

Chlamydien gelten als weit verbreitet und nahezu überall vorkommend. Bezüglich ihres Vorkommens und der Bedeutung als Krankheitsursache beim Pferd ist wenig bekannt. Die konkrete Bedeutung der einzelnen Chlamydien-Spezies beim Pferd und die mögliche ätiologische Beteiligung an verschiedenen Krankheitsbildern ist zum großen Teil noch nicht abgeklärt (GLAVITS et al. 1988; HENNING et al., 2000).

### **5.1 Seroprävalenzstudien**

Chlamydien-Infektionen scheinen nach den vorliegenden Untersuchungen bei deutschen Pferden weit verbreitet zu sein. Bei Pferden aus allen vier Bundesländern (Niedersachsen, Hessen, Baden-Württemberg, Bayern), aus denen das Probenmaterial stammte, konnten Chlamydien-Infektionen serologisch mit dem ELISA nachgewiesen werden.

Die Seroprävalenz im Rahmen dieser Untersuchungen mit dem ELISA betrug 16,1%. Nach HUELSEY (1999) wiesen niedersächsische Stuten mit dem ELISA eine Seroprävalenz von 7% auf. Anzumerken ist aber, daß die von HUELSEY untersuchten Stuten nach dem Kriterium „Stuten mit Fruchtbarkeitsstörungen“ vorselektiert waren.

Weitere Vergleiche zu Ergebnissen anderer Untersucher erscheinen wenig sinnvoll, da bei diesen als Untersuchungsmethode fast ausschließlich die KBR zur Anwendung kam. Bei verschiedenen Studien mit der KBR reichten die Seroprävalenzen von 2,2% bis 14,9%. Nach einer Untersuchung von STUDDERT (1969) mit der KBR war die Seroprävalenz mit 69% bei australischen Pferden deutlich höher. Unklar ist, ob der hohe Wert durch ein epidemisches Geschehen beeinflußt wurde oder ob der sehr geringe Stichprobenumfang von nur sechzehn Proben das Ergebnis verfälscht hat.

DI FRANCESCO et al. (2006) untersuchten Blutserumproben von 731 klinisch gesunden, italienischen Pferden mit einem Mikroimmunfluoreszenz-Test auf das Vorkommen von *Chlamydophila pneumoniae*. Die Seroprävalenz lag bei 26,5%. Andere

serologische Untersuchungen zum Vorkommen von *Chlamydophila pneumoniae* bei Pferden liegen nicht vor.

Da es keine Empfehlung der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) bezüglich der Referenz-Methoden zum indirekten und direkten Chlamydien-Nachweis bei Pferden gibt (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008), erschwert dies die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse.

Bei Gegenüberstellung der im ELISA und KBR erzielten Ergebnisse der eigenen Untersuchungen wurde eine geringe Übereinstimmung der Ergebnisse festgestellt. Sechs von vierzig Proben waren nur im ELISA positiv und eine Probe nur in der KBR. Lediglich eine Probe wurde von beiden Nachweismethoden als positiv erkannt. Ursache für eine niedrige Sensitivität der KBR könnte das Vorliegen "Nicht-Komplement-Bindender"-Antikörper sein. Wenige Autoren diskutieren auch das Vorkommen von falsch-positiven Ergebnissen im ELISA (VERMINNEN et al., 2006; MIYASHITA et al., 2008). Insgesamt erscheint der ELISA im Vergleich zur KBR die bessere Untersuchungsmethode zu sein, da bei den meisten vergleichenden Untersuchungen bei anderen Tierarten der ELISA hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität deutlich besser als die KBR abgeschnitten hat (PEREZ-MARTINEZ et al., 1986; GRIFFITHS et al., 1996). Dies betrifft insbesondere die Sensitivität (DAWSON et al., 1986; CEVENINI et al., 1989; MARKEY et al., 1993; ANDERSON et al., 1995).

Unabhängig qualitativer Eigenschaften hat der ELISA gegenüber der KBR die Vorteile, daß die Untersuchungsergebnisse schneller vorliegen, ein höherer Probendurchsatz möglich, der Arbeitsaufwand geringer und das Ergebnis durch photometrische Messung objektivierbar ist.

Die serologische Verlaufsuntersuchung bei Vollbluthengsten ergab, daß bei den seropositiven Hengsten bei der Kontrolluntersuchung nach einem Monat keine Antikörper-Titer mehr nachgewiesen wurden. Zudem erbrachten die Ergebnisse der anderen serologischen Untersuchungen auch keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Seropositivität der einzelnen Pferde im zeitlichen Abstand von sechs Monaten. Daher erscheint die Persistenz von Chlamydien-Antikörpern beim Pferd häufig nicht stark ausgeprägt zu sein. Die Ursache für eine kurze Antikörper-Persistenz könnte eine

Bedeutung von latenten und lokalen Infektionen mit einer schwach ausgeprägten Immunantwort sein (EGGEMANN et al., 2000).

Der Nachweis von Chlamydien-Infektionen im Rahmen dieser Untersuchungen wurde vom Geschlecht, Alter, Nutzung, Haltungsform und der Betriebsgröße nicht signifikant beeinflusst. MAIR und WILLS (1992) konnten ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zu Alter und Rasse feststellen. Bei den Untersuchungen von HERFEN et al. (1999) bestand ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Nachweishäufigkeit und dem Alter der Pferde.

MIYAMOTO et. al. (1993) wiesen dagegen bei einer Untersuchung, die an japanischen Rennpferden durchgeführt wurde, eine signifikant erhöhte Seroprävalenz bei zwei- bis fünfjährigen Rennpferden nach. Die Autoren vermuten als Ursachen erhöhten Streß während der Ausbildung zum Rennpferd und einen erhöhten Kontakt zu Pferden, die aus fremden Ställen stammen.

Vergleichbare Untersuchungen bezüglich des Chlamydien-Nachweises in Abhängigkeit vom Geschlecht, Nutzung, Haltungsform und Betriebsgröße liegen nicht vor.

Ein jahreszeitlich gehäuftes Auftreten von Chlamydien-Infektionen beim Pferd konnte nicht nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Ergebnisse von BOCKLISCH et al., (1991).

## **5.2 Direkte Nachweismethoden**

Neben dem Nachweis von Chlamydien-Antigen in den Atemwegen (Nasenschleimhaut) und im Geschlechtstrakt (Zervikalschleimhaut) hessischer Pferde wurden Chlamydien auch im Sperma hessischer Hengste nachgewiesen.

Da der Nachweis signifikant häufiger in Sperma von Hengsten gelang, die im Natursprung eingesetzt werden, ist anzunehmen, daß diese Hengste einem erhöhten Infektionsrisiko ausgesetzt sind. Eine Bedeutung der venerischen Übertragung ist nicht ausgeschlossen.

Die Pathogenität von Chlamydien für Stuten und Hengste ist momentan unklar. Für HUELSEY (1999) stellen Chlamydien-Infektionen bei Stuten mit hoher

Wahrscheinlichkeit einen kontrazeptiven Faktor dar, obwohl dies patho-histologisch nicht nachgewiesen werden konnte und die Anzahl der Chlamydien-positiven Stuten in dieser Studie zu gering war, um mit statistisch abgesicherten Zahlen argumentieren zu können. Mehr Hinweise gibt es im Hinblick auf eine ätiologische Beteiligung von Chlamydien-Infektionen bei Aborten von Stuten (POPOVICI und HIASTRU, 1969; DILBECK et al., 1985; GLAVITS et al., 1988; BOCKLISCH et al., 1991; HENNING et al., 2000). Obwohl auch hier Chlamydien-Infektionen als Abortursache bei der Stute noch nicht lückenlos bewiesen sind (HENNING et al., 2000).

Kulturelle Untersuchungen sind sehr aufwendig und können auch sehr viel Zeit in Anspruch nehmen. Im positiven Fall haben sie jedoch eine hohe diagnostische Aussagekraft. Neben dieser diagnostischen Nutzung sind sie aber von viel größerer Bedeutung als Zuträger für die Forschung und Erreger-Charakterisierung. Die Kultur ist aber nur erfolgreich bei ausreichend hohen Keimzahlen vermehrungsfähiger Elementarkörperchen im Untersuchungsmaterial. Da die Vermehrungsfähigkeit aber vom Material stark beeinflusst wird, besitzt das Ergebnis der kulturellen Untersuchung aus diagnostischer Sicht nur im positiven Fall eine Aussagefähigkeit.

Um diesbezüglich gute Voraussetzungen zu haben, sollte das Probenmaterial direkt nach der Entnahme mit einem speziellen Transportmedium versetzt werden und der Kultivierungsversuch noch am gleichen Tag beginnen, was aber unter Praxisbedingungen häufig nicht möglich ist. Das Einfrieren des Probenmaterials bringt den Nachteil mit sich, daß es zu Einfrierverlusten von 80-90% kommen kann.

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen gelang es nicht, mit kulturellen Techniken aus vierzig Nasen- und zwanzig Zervixtupferproben Chlamydien zu isolieren.

Mit alternativen Techniken waren jedoch (PCR sechs Nasen- und elf Zervixtupferproben; Capture-ELISA 15 Nasen- beziehungsweise fünf Zervixtupferproben) Chlamydien nachweisbar. Da die Kultivierung weder mit einer etablierten Zellkulturmethode, noch durch Kultivierung im embryonierten Hühnerei gelang, müssen diese Methoden weiter optimiert werden.

Die Ursache für die fehlgeschlagenen Kultivierungsversuche kann darin liegen, daß die Kultivierung von Chlamydien-Stämmen vom Pferd schwieriger ist, als Stämme von anderen Tierarten. Beispielsweise ist durch Untersuchungen belegt, daß Chlamydien-



Stämme vom Menschen und Rind deutlich schwerer zu isolieren sind, als die von Psittaziden oder von Schafen (SACHSE und GROSSMANN, 2002). THEEGARTEN et al. (2008) berichten von allgemeinen Schwierigkeiten, Chlamydien erfolgreich zu isolieren. Es könnte auch sein, daß die Zahl lebender Chlamydien für eine erfolgreiche Kultivierung nicht ausreichte. Dies wird für die wahrscheinlichste Ursache gehalten.

Seit Beginn der 90er Jahre hat die PCR vermehrt Eingang in die Chlamydien-Forschung und -Diagnostik gefunden (SACHSE und GROSSMANN, 2002). Vorteile der PCR sind, daß innerhalb eines Arbeitstages ein verwertbares Ergebnis vorliegt und die hier zur Anwendung gekommene Methode bezüglich ihrer Nachweisgrenze (bis eine Einschluß-Bildende-Einheit) den anderen Untersuchungsmethoden überlegen ist (FISCHER, 1995). Aufgrund der genau definierten Eigenschaft der Primer und der mehrstufigen DNS-Amplifikation besitzt die PCR eine sehr hohe Spezifität. Weiterhin besitzt die PCR den Vorteil, daß klinisches Probenmaterial aller Art direkt ohne Anzüchtung untersucht werden kann (SACHSE und GROSSMANN, 2002). Im Gegensatz zu den Kultivierungsmethoden müssen bei Anwendung der PCR weniger besondere Anforderungen an den Transport des Probenmaterials gestellt werden.

Bezüglich der Untersuchungsergebnisse der Nasen- und Zervixtupferproben mit Capture-ELISA und PCR liegt keine große Übereinstimmung vor. Der Mc Nemar-Test bestätigt sogar einen signifikanten Unterschied, was die fehlende Übereinstimmung der Ergebnisse von Capture-ELISA und PCR angeht. Daher ist die Möglichkeit von falsch-positiven- und falsch-negativen Ergebnissen zu diskutieren.

Es wurden bei Gegenüberstellung verschiedener Techniken zum Erreger-Nachweis bei vier Nasen- und acht Zervixtupferproben nur mit der PCR Chlamydien nachgewiesen. Dies kann man leicht durch die deutlich niedrigere Nachweisgrenze der PCR (bis eine Einschluß-Bildende-Einheit) gegenüber des Capture-ELISA (4000 Partikel) erklären. Ein Nachteil der PCR ist dagegen, daß schon eine leichte Kontaminierung des Probenmaterials mit Chlamydien-DNS zu einem falsch-positiven Ergebnis führen kann (FISCHER, 1995; SACHSE und GROSSMANN, 2002). Bei den vorliegenden Untersuchungen ist nicht mit der Verfälschung der Ergebnisse durch eine Kontamination zu rechnen, da das Probenmaterial vorschriftsmäßig entnommen, gelagert, unter einer

Reinraumwerkbank aufbereitet und danach in geschlossenen Systemen, in denen nicht mit einer Chlamydien-Kontamination zu rechnen ist, untersucht wurde.

Aber sehr unerwartet war, daß es einige Proben gab (dreizehn Nasen- und zwei Zervixtupferproben), die im Capture-ELISA Chlamydien-Antigen positiv waren und die PCR ein negatives Ergebnis erbrachte. Hier ist davon auszugehen, daß es sich um falsch-positive Ergebnisse handelt, da der Capture-ELISA eine deutlich höhere Nachweisgrenze (4000 Partikel) im Vergleich zu der zur Anwendung gekommenen PCR hat (FISCHER, 1995; EGGEMANN et al., 2000). Die Ursache für falsch-positive Ergebnisse im Capture-ELISA sind häufig Kreuzreaktionen mit anderen Gram-negativen Bakterien, da bestimmte LPS-Epitope, auf denen der Antigen-Nachweis beruht, auch bei anderen Bakterien wie zum Beispiel *Bacillus* Spezies, *Enterobacter cloacae* und *E. coli* anzutreffen sind (SACHSE und GROSSMANN, 2002).

Auffällig war die höhere Anzahl vermutlich falsch-positiver Ergebnisse des Capture-ELISA bei der Untersuchung der Nasen- im Vergleich zu den Zervixtupferproben. Dies ist wahrscheinlich durch die höhere Konzentration von Gram-negativen Bakterien im Bereich der Nase zu erklären. Im Gegensatz zum leicht zu erreichenden Naseneingang müssen Bakterien, die sich im Bereich der Zervix befinden, die natürlichen Barrieren Schamlippen, Scheidenvorhof und das Scheidengewölbe überwinden.

Nach Gegenüberstellung des Capture-ELISA, der PCR, der Kultivierung im embryonierten Hühnerei und der Zellkulturmethode erscheint die PCR hinsichtlich des Nachweises von Chlamydien in Nasen- und Zervixtupferproben von Pferden aufgrund ihrer besseren Sensitivität und Spezifität den anderen Untersuchungsmethoden überlegen zu sein.

## **6. Zusammenfassung**

Im Rahmen einer Seroprävalenzstudie zur Verbreitung von Chlamydien-Infektionen in bestimmten Bereichen Deutschlands, wurde das Blutserum von 329 Pferden aus verschiedenen deutschen Bundesländern (Niedersachsen, Hessen, Bayern und Baden-Württemberg) mit dem ELISA auf das Vorkommen von Chlamydien-Antikörpern untersucht. Chlamydien-Antikörper wurden bei 53 der 329 Pferde nachgewiesen (16,1%) und zwar bei Pferden aus allen Bundesländern, aus denen das Probenmaterial stammte.

Bei der Untersuchung von Probenmaterial von 95 hessischen Pferden mittels ELISA und dem Capture-ELISA, ob sich spezifische Einflußgrößen auf den Nachweis einer Chlamydien-Infektion auswirken, wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis und dem Geschlecht, Alter, Nutzung, Haltungsform und der Betriebsgröße nachgewiesen.

Die in der serologischen Verlaufsuntersuchung zur Antikörpertiter-Persistenz bei neun Vollblutdeckhengsten mit dem ELISA aufgezeigte kurze Persistenz von maximal einem Monat ist ein Hinweis für eine schwach ausgeprägte Immunreaktion bei subklinischen Chlamydien-Infektionen beim Pferd.

Bezüglich der Bedeutung einer venerischen Übertragung gelang der Chlamydien-Nachweis mit der PCR signifikant häufiger im Sperma von Natursprunghengsten (7,1%) als bei Besamungshengsten (0%). Das könnte darauf hinweisen, daß diese Hengste einem erhöhtem Infektionsrisiko ausgesetzt sind.

Bei der Verlaufsuntersuchung mit direkten und indirekten Untersuchungsmethoden gelang bei keiner der Nasen- und Zervixtupferproben die Anzüchtung von Chlamydien in embryonierten Hühnereiern oder mit der BGM-Zellkultur. Die Anzucht mit Material von Nasen- und Zervixtupferproben ist daher wahrscheinlich nicht zum Nachweis von subklinischen Infektionen bei Pferden in der Routinediagnostik geeignet. Weiterhin wurde belegt, daß lokale Infektionen selten mit einer nachweisbaren Antikörperbildung einhergehen.

Im Rahmen der Verlaufsuntersuchung mit indirekten und direkten Untersuchungsverfahren fiel insbesondere der Capture-ELISA bei der Untersuchung der Nasentupferproben durch viele vermutlich falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse im Vergleich zur PCR auf. Die falsch-positiven Ergebnisse des Capture-ELISA lassen sich wahrscheinlich durch Kreuzreaktionen mit anderen Bakterien erklären. Die falsch-negativen Ergebnisse des Capture-ELISA durch die deutlich höhere Nachweisgrenze des Capture-ELISA (4000 Partikel) im Vergleich zu der PCR (bis eine Einschluß-Bildende-Einheit).

## **7. Summary**

As part of a seroprevalence study looking into the spread of chlamydial infections in different areas of Germany, the blood serum of 329 horses was examined from various German states (Lower Saxony, Hesse, Bavaria and Baden-Württemberg) with the ELISA test for the presence of chlamydia antibodies. Chlamydia antibodies were detected in 53 of the 329 horses (16,1%). The positive cases were distributed to all counties from which the samples came. The examination of samples of 95 Hessian horses by the ELISA and the Capture-ELISA methods, looking for specific parameters influencing a chlamydial infection, found no significant correlation between a positive test, the sex, age, use of the horses, art of holding and the farm size.

The serological examination in the course of the antibody persistence in nine thoroughbred covering stallions with the ELISA test showed a short persistence of antibodies of a maximum of one month. This could be the result of a weak immune response in subclinical chlamydial infections in horses.

Chlamydia detection in the semen achieved by PCR was significantly higher in stallions covering naturally (7,1%) than in stallions in artificial insemination (0%). This could indicate that these stallions are exposed to an increased risk of infection.

The cultivation of chlamydia by inoculation from material of nasal and cervical swabs into embryonated chicken eggs or onto cell monolayers was not successful.

The cultivation of chlamydia with material of nasal and cervical swabs is probably not suitable for the detection of subclinical chlamydial infections in horses as a routine diagnosis. This was further evidenced in that local infections were often not associated with a detectable antibody production.

Analyzing the results of examining the nasal swabs by the Capture-ELISA-technique a lot of false-positive or false-negative results were suspected to be. The false-positive results of the capture ELISA can probably be explained by cross-reactions with other bacteria. The false-negative results of the capture-ELISA probably by the much higher detection limit of the capture-ELISA (4000 particles) compared to the PCR (down to one inclusion-forming-unit).

## **8. Literaturverzeichnis**

AGUERO-ROSENFELD M., NOWAKOWSKI J., BITTKER S., COOPER D., NADELMAN R., WORMSER G. (1996)

Evolution of the serologic response to *Borrelia burgdorferi* in treated patients with culture-confirmed erythema migrans.

J. Clin. Microbiol., 34(1): 1-9.

ALTSCHUL S., GISH W., MILLER W., MYERS E. and LIPMAN D. (1990)

Basic local alignment search tool.

J. Mol. Biol., 215: 403-410.

AMUSATEGUI I., SAINZ A. and TESOURO M. (2006)

Serological evaluation of *Anaplasma phagocytophilum* infection in livestock in northwestern Spain.

Ann. N.Y. Acad. Sci.: 1078, 487-90.

ANDERSON B., DAWSON J., JONES D. and WILSON K. (1991)

*Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis.

J. Clin. Microbiol., 29: 2838-2842.

ANDERSON I., HERRING A., JONES G., LOW C., GREIG A. (1995)

Development and evaluation of an indirect ELISA to detect antibodies to abortion strains of *Chlamydia psittaci* in sheep sera.

Vet. Microbiol., 43: 1-12.

ARTURSSON K., GUNARSSON A., WIKSTROM U., ENGVALL E. (1999)

A serological and clinical follow-up in horses with confirmed equine granulocytic ehrlichiosis.

Equine Vet. J., 31(6): 473-7.

ATWILL E., MOHAMMED H., LOPEZ J., MC CULLOCH C., DUBOVI E. (1996)

Cross-sectional evaluation of environmental, host and management factors associated with risk of seropositivity to *Ehrlichia risticii* in horses of new state.

Am. J. Vet. Res., 57(3): 278-285.

BAKKEN J., KRUETH J., TILDEN R., DUMLER J. and KRISTIANSEN B. (1996)

Serological evidence of human granulocytic ehrlichiosis in Norway.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 15: 829-832.

BARLOUGH J., MADIGAN J., DE ROCK E., DUMLER J., BAKKEN J. (1995)

Protection against *Ehrlichia equi* is conferred by prior infection with the human granulocytotropic *Ehrlichia* (HGE agent).

J. Clin. Microbiol., 33(12): 3333-3334.

BARLOUGH J., MADIGAN J., KRAMER V., CLOVER J., HUI L., WEBB J., VREDEVOE L. (1997)

*Ehrlichia phagocytophila* genogroup *rickettsiae* in ixoded ticks from California collected in 1995 and 1996.

J. Clin. Microbiol., 35(8): 2018-2021.

BARLOUGH J., REUBEL G., MADIGAN J., VREDEVOE L., MILLER P., RIKIHISA Y. (1998)

Detection of *Ehrlichia risticii*, the agent of Potomac horse fever, in freshwater stream snails (Pleuroceridae: *Juga* spp.) from Northern California.

Appl. Environ. Microbiol., 64(8): 2888-2893.

BISPING M. (1993)

Untersuchungen über die Bedeutung von Chlamydien als Aborterreger beim Pferd.  
Vet. Med. Diss., Hannover.

BISWAS B., MUKHERJEE D., MATTINGLY-NAPIER B., DUTTA S. (1991)

Diagnostic application of polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia risticii* in equine monocytic ehrlichiosis (Potomac horse fever).

J. Clin. Microbiol., 29(10): 2228-2233.

BLANCO-LOIZELIER A. and PAGE L. (1974)

Unusual forms of Chlamydiosis in Spanish livestock.

Vet. Bull., 45: 88.

BOCKLISCH H., LUDWIG C., LANGE S. (1991)

Chlamydia as the cause of abortions in horses.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 104(4): 119-24.

BREES D., SONDHOFF A., KLUGE J., ANDREASEN C., BROWN C. (1999)

*Lawsonia intracellularis*-like organism infection in a miniature foal.

JAVMA, Vol. 215, No.4.

BREITSCHWERDT E., HEGARTY B., HANCOCK S. (1998)

Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii* or *Bartonella vinsonii*.

J. Clin. Microbiol., 36: 2645-2651.

BROUQUI P., DUMLER J., LIENHARD R., BROSSARD M. and RAOULT D. (1995)

Human granulocytic ehrlichiosis in Europe.

Lancet, 346: 782-783.

BURRELL M., CHALMERS W., KEWLEY D. (1986)

Isolation of *Chlamydia psittaci* from the respiratory tract and conjunctivae of thoroughbred horses.

Vet. Rec., 119(12): 302-3.

- BUTAYE P., DUCATELLE R., DE BACKER P., VERMEERSCH H., REMON J.,  
HAESEBROUCK F. (1997)  
In vitro activities of doxycycline and enrofloxacin against European *Chlamydia psittaci*  
strains from turkeys.  
*Antimicrob. Agents Chemother.*, 41(12): 2800-2801.
- CALDWELL H. and JUDD R. (1982)  
Structural analysis of chlamydial major outer membrane proteins.  
*Infect. Immun.*, 38: 960-968.
- CALDWELL H., KROMHOUT J. and SCHACHTER J. (1981)  
Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of  
*Chlamydia trachomatis*.  
*Infect. Immun.*, 31: 1161-1176.
- CAMPBELL T. (1988)  
Avian haematology and cytology first ed..  
Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- CEVENINI R., MORONI A., SAMBRI V., PERINI S., LA PLACA M. (1989)  
Serological response to chlamydial infection in sheep, studied by enzyme-linked  
immunosorbent assay and immunoblotting.  
*FEMS Microbiol. Immunol.*, 47: 459-464.
- CHEN S., DUMLER J., BAKKEN J. and WALKER D. (1994)  
Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human  
disease.  
*J. Clin. Microb.*, 32: 589-595.
- COFFMAN E., ABD-ELDAIM M., Craig L. (2008)  
Abortion in a horse following *Neorickettsia risticii* infection.  
*J. Vet. Diagn. Invest.*, 20(6): 827-30.
- COOPER D., SWANSON D., GEBHART C. (1996)  
Diagnosis of proliferative enteritis in frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded  
tissues from a hamster, horse, deer and ostrich using a *Lawsonia intracellularis* specific  
multiplex PCR assay.  
Division of Comparative Medicine, Medical School, University of Minnesota.
- CSUKÁS Z., HAJTÓS I., FARAGÓ T. and KOVÁCS M. (1984)  
Detection of complement fixing antibodies for *Chlamydia* in Hungarian equine herds.  
*Acta Microbiol. Hung.*, 31: 240.
- DAGNALL G. and WILSMORE A. (1990)  
A simple staining method for the identification of chlamydial elementary bodies in the  
fetal membranes of sheep affected by ovine enzootic abortion.  
*Vet. Microbiol.*, 21: 233-239.



DAUVILLIER J., PICANDET V., HAREL J., GOTTSCHALK M., DES ROSIERS R., JEAN D., LAVOIE J. (2006)

Diagnostic and epidemiological features of *Lawsonia intracellularis* enteropathy in two foals.

Can. Vet. J., 47(7): 689-91.

DAWSON J., ABEYGUNAWARDENA I., HOLLAND C., BUESE M. and RISTIC M. (1988)

Susceptibility of cats to infection with *Ehrlichia risticii*, causative agent of equine monocytic ehrlichiosis.

Am. J. Vet. Res, 49: 2096-2100.

DAWSON J., RIKIHISA S., EWING S. and FISHBEIN, D. (1991)

Serologic diagnosis of human ehrlichiosis using two *Ehrlichia canis* isolates.

J. Infect. Dis., 163: 564-567.

DAWSON M., VENABLES C., WILSMORE A. (1986)

Immune response of sheep experimentally infected with ovine abortion isolates of *Chlamydia psittaci*.

I.D. Aitken, Chlamydial diseases of ruminants. Commission of the European Communities, Luxembourg, 97-105.

DES VIGNES F. and FISCH D. (1997)

Transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by host-seeking *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) in southern New York State.

J. Med. Entomol., 34: 379-382.

DI FRANCESCO A., DONATI M., MATTIOLI L., NALDI M., SALVATORE D., POGLAYEN G., CEVENINI R., BALDELLI R. (2006)

*Chlamydophila pneumoniae* in horses: a seroepidemiological survey in Italy.

New Microbiol., 29(4): 303-5.

DILBECK P., EVERMANN J., KRAFT S., TYLER S. (1985)

Equine chlamydial infections: comparative diagnostic aspects with bovine and ovine chlamydiosis.

Agris record, 28: 285-296.

DRACHENBERG A., SCHUMANN K. (1985)

Vergleichende Untersuchungen von Serumproben mittels Röhrchen- und Mikro-Komplementbindungsreaktion.

Monatsh. Veterinärmed., 40: 382-385.

DUMLER J., BARBET A., BEKKER C., DASCH G., PALMER G., RAY S., RIKIHISA Y., Rurangirwa F. (2001)

Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*.

Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51(P6): 2145-65.

DUTTA S., MYRUP A., RICE R., ROBL M. and HAMMOND R. (1985)

Experimental reproduction of Potomac horse fever in horses with a newly isolated *Ehrlichia* organism.

J. Clin. Microbiol., 22: 265-269.

DUTTA S., VEMULAPALLI R., BISWAS B. (1998)

Association of deficiency in antibody response to vaccine and heterogeneity of *Ehrlichia risticii* strains with Potomac horse fever vaccine failure in horses.

J.Clin. Microbiol., 36: 506-512.

EGGEMANN G., WENDT M., HOELZLE L., JÄGER C., WEISS R., FAILING K. (2000)

Prevalence of Chlamydia infections in breeding sows and their importance in reproductive failure.

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr., 107(1): 3-10.

ENGVAL E., PETTERSSON B., PERSSON M., ARTURSSON K., JOHANSSON K. (1996)

A 16S-rRNA-based PCR assay for detection and identification of granulocytic *Ehrlichia* species in dogs, horses and cattle.

J. Clin. Microbiol., 34(9): 2170-4.

EVERETT K., BUSH R., ANDERSEN A. (1999)

Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species and standards for the identification of organisms.

Int. J. Syst. Bacteriol., 49(Pt 2): 415-40.

FEARY D., GEBHART C., PUSTERLA N. (2007)

*Lawsonia intracellularis* proliferative enteropathy in a foal.

Schweiz Arch. Tierheilkd., 149(3): 129-33.

FISCHER D. (1995)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Diagnostik von Chlamydien-Infektionen.

Gießen, Univ., Veterinärmed. Fak., Diss..

FORSTER J., WITTENBRINK M., HANI H., CORBOZ L., POSPISCHIL A (1997)  
Absence of Chlamydia as an aetiological factor in aborting mares.  
Vet. Rec., 141(16): 424.

FRANK N., FISHMAN E., GEBHART C. and LEVY M. (1998)  
Lawsonia intracellularis proliferative enteropathy in a weanling foal.  
Departments of Vet. Clin. Sciences and Pathobiology, School of Veterinary Medicine,  
Purdue University and Department of Veterinary Pathobiology, College of Veterinary  
Medicine, University of Minnesota.

FRAZER M. (2008)  
Lawsonia intracellularis infection in horses: 2005-2007.  
J. Vet. Intern. Med., 22(5): 1243-8.

FRIEDHOFF K. (1982)  
Rickettsieninfektionen (Ehrlichia, Eperythrozoon, Haemobartonella) bei Haustieren in  
Deutschland.  
Fortschritte Vet. Med. Beihefte Zentralbl. Veterinärmed. 35, 204-209.

FRIIS R. (1972)  
Interaction of L cells and Chlamydia psittaci. Entry of the parasite and host responses to  
its development.  
J. Bacteriol., 110: 706-721.

FUDGE A. (1989)  
Clinical experiences in the diagnosis of avian chlamydiosis.  
Avian Vet., 3: 75-77.

FUKUSHI H., OGAWA H., MORIKOSHI T., OKUDA Y., SHIMKURA S. and HIRAI, K.  
(1985)  
Chlamydial complement fixing antibodies in cows, horses, and pigs from 1980 to 1983.  
Res. Bull. Fac. Agn. Gifu. Univ., 50: 259.

GAEDE W., SCHLIEPHAKE A., RECKLING K., HOTZEL H., SACHSE K. (2008)  
Nachweis von Chlamydophila caviae in einem Pferdebestand.  
4. Arbeitstagung des nationalen Referenzlabores für Psittakose, Sept. 2008, Jena.

GARETT A., HARRISON M. and MANIRE G. (1974)  
A search for the bacterial mucopeptide component, muramic acid, in Chlamydia.  
J. Gen. Microbiol., 80: 315-140.

GERHARDS H., OFFENEY F. and FRIEDHOFF K. (1987)  
Ehrlichia-Infektion beim Pferd.  
Pferdeheilkunde, 3: 283-291.

- GIMÉNEZ D. (1964)  
Staining Rickettsiae in yolk-sac-cultures.  
Stain. Techn., 39: 135-140.
- GLAVITS R., MOLNAR, T. and RADY M. (1988)  
Chlamydia-induced abortion in a horse.  
Acta Vet. Hung., 36: 33-36.
- GOETZ T., HEANEY K., HOLLAND C., PETERSON D., REED S., STUBER R. and WYCHARA S. (1991)  
Potomac horse fever-Proceedings of a round table.  
Schering-Plough Animal Health, Kenilworth, N.J., 1-31.
- GOODMAN J., NELSON C., VITALE B., MADIGAN J., DUMLER J., KUURTI T. and MUNDERLOH U. (1996)  
Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis.  
N. Engl. J. Med., 334: 209-215.
- GREIG B., ASANOVICH K., ARMSTRONG P., DUMLER J. (1996)  
Geographic, clinical, serologic and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs.  
J. Clin. Microbiol., 34: 44-48.
- GRIBBLE D. (1969)  
Equine ehrlichiosis.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 155: 462-469.
- GRIFFITHS P., PLATER J., HORIGAN M., ROSE M., VENABLES C., DAWSON M. (1996)  
Serological diagnosis of ovine enzootic abortion by comparative inclusion immunofluorescence assay, recombinant lipopolysaccharide enzyme-linked immunosorbent assay, and complement fixation test.  
Journal of Clinical Microbiology: 1512-1518.
- GRIMES J. (1989)  
Serodiagnosis of avian chlamydia infections.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 195: 1561-1563.
- HARTELT K., OEHME R., FRANK H., BROCKMANN S., HASSLER D. and KIMMIG P. (2004)  
Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (Ehrlichia sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp. and *Babesia* sp. in Southern Germany.  
Int. J. Med. Microbiol., 293(37): 86-92.
- HENNING K., SACHSE K., STING R. (2000)  
Demonstration of Chlamydia from an equine abortion.  
Dtsch. Tierärztl. Wochenschr., 107(2): 49-52.

- HERFEN K., JÄGER C., WEHREND A. (1999)  
Genital chlamydial infection in mares and their clinical significance.  
Reprod. Domest. Anim., 34: 20.
- HERMANN M., BAUMANN D., LUTZ H., WILD P. (1985)  
Erster diagnostizierter Fall von equiner Ehrlichiose in der Schweiz.  
Pferdeheilkunde, 1: 247-250.
- HODINKA R., DAVIS C., CHOONG J. and WYRICK P. (1988)  
Ultrastructural study of endocytosis of Chlamydia trachomatis by Mc Coy cells.  
Infect. Immun., 56: 1456-1463.
- HODINKA R. and WYRICK P. (1986)  
Ultrastructural study of mode of entry of Chlamydia psittaci into L-929 cells.  
Infect. Immun., 54: 855-863.
- HUELSEY A. (2001)  
Chlamydia psittaci im equinen Endometrium.  
Vet. Med. Diss., Leipzig.
- IQBAL Z., CHAICHANASIRIWITHAYA W., RIKIHISA Y. (1994)  
Comparison of PCR and Western immunoblot analysis in early diagnosis of canine ehrlichiosis.  
J. Clin. Microbiol., 32: 1658-1662.
- JOHANSSON K., PETERSSON B., UHLEN M., GUNNARSON A., MALMQVIST M., OLSSON E. (1995)  
Identification of the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in Swedish dogs and horses by direct solid phase sequencing of PCR products from the 16SrRNA gene.  
Res. Vet. Sci., 58(2): 109-112.
- JOHNSTON S. and SIEGEL C. (1992)  
Comparison of Buffalo green monkey kidney cells and Mc Coy cells for the isolation of Chlamydia trachomatis in shell vial centrifugation culture.  
Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 15(4): 355-7.
- JONES G., DAVIES P., ROSE R., WARD G. and MURTAUGH M. (1993)  
Comparison of techniques for diagnosis of proliferative enteritis of swine.  
Am. J. Vet. Res., 54: 1980-1985.
- KAKOMA I., HANSEN R., ANDERSON B., HANLEY T., SIMS K., LIU L., BELLAMY C., LONG M. and BAEK B. (1994)  
Cultural, molecular and immunological characterization of the etiologic agent for atypical canine ehrlichiosis.  
J. Clin. Microbiol., 32: 170-175.

- KALETA E., KRAUTWALD-JUNGHANNS M., REDMANN T. (1998)  
Psittacosis (chlamydiosis) of birds and the necessity of government disease control.  
Tierärztl. Praxis, 26(4): 295-301.
- KARO M. (1991)  
Antigen-Fangtest (Capture-ELISA/-ELIFA) zum Nachweis von Chlamydien auf der Basis eines monoklonalen Antikörpers als Fang- und Nachweis-Antikörper.  
Gießen, Univ., Veterinärmed. Fak., Diss..
- KIMURA M., KISHIMOTO T., NIKI Y., SOEJIMA R. (1993)  
In vitro and in vivo antichlamydial activities of newly developed quinolone antimicrobial agents.  
Antimicrob. Agents Chemother., 37(4): 801-3.
- KNOWLES R., ANDERSON D., SHIPLEY W., WHITTLOCK R., PERRY B. and DAVIDSON J. (1983)  
Acute equine diarrhea syndrome (AEDS): a preliminary report.  
Proc. Am. Vet. Med. Assoc., 181: 236-238.
- KÖLBL O. (1969)  
Untersuchungen über das Vorkommen von Miyagawanellen beim Schwein.  
Wien. Tierärztl. Monatsschr., 56: 332-335.
- KORBUTIAK E. and SCHNEIDERS D. (1994)  
Equine granulocytic ehrlichiosis in the UK.  
Vet. Rec., 135: 387-388.
- KRECH T., BLECKMANN M., PAATZ R. (1989)  
Comparison of buffalo green monkey cells and Mc Coy cells for isolation of Chlamydia trachomatis in a microtiter system.  
J. Clin. Microbiol., 27(10): 2364-5.
- KUO C., JACKSON L., LEE A. and GRAYSTON J. (1996)  
In vitro activities of azithromycine, clarithromycine and other antibiotics against Chlamydia pneumoniae.  
Antimicrob. Agents and Chemother., 40(11): 2669-2670.
- LAPAGE S., SNEATH P., LESSEL E., SKERMAN V., SEELIGER H. and CLARK W. (1992)  
International Code of Nomenclature of Bacteria (1990 Revision).  
Bacteriological Code, Washington DC: American Society for Microbiology.

LEBLOND A., PRADIER S., PITEL P., FORTIER G., BOIREAU P., CHADOEUF J. and SABATIER P. (2005)

An epidemiological survey of equine anaplasmosis (*Anaplasma phagocytophilum*) in southern France.

Rev. Sci. Tech., 24: 899-908.

LEVI O., WANER T., BANETH G., KEYSARY A., BRUCHIM Y., SILVERMAN J. und HARRUS S. (2006)

Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* among healthy dogs and horses in Israel.

J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health., 53: 78-80.

LEWIS G., HUXSOLL D., RISTIC M., JOHNSON A. (1975)

Experimentally induced infection of dogs, cats and nonhuman primates with *Ehrlichia equi*, etiologic agent of equine ehrlichiosis.

Am. J. Vet. Res., 36(1): 85-8.

LILLINI E., MACRI G., PROIETTI G. und SCARPULLA M. (2006)

New findings on anaplasmosis caused by infection with *Anaplasma phagocytophilum*.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 1081: 360-370.

MADIGAN J. (1993)

Equine ehrlichiosis.

Vet. Clin. North Am. Equine Pract., 9(2): 423-428.

MADIGAN J., BARLOUGH J., DUMLER J., SCHANKMAN N., DE ROCK E. (1996)

Equine granulocytic ehrlichiosis in Connecticut caused by an agent resembling the human granulocytotropic *Ehrlichia*.

J. Clin. Microbiol., 34: 434-435.

MADIGAN J., GRIBBLE D. (1987)

Equine ehrlichiosis in northern California: 49 cases (1968-1981).

J. Am. Vet. Med. Ass., 190: 445-448.

MADIGAN J., RICHTER P., KIMSEY R., BARLOUGH J., BAKKEN J. and DUMLER J. (1995)

Transmission and passage in horses of the agent of human granulocytic ehrlichiosis.

J. Infect. Dis., 172: 1141-1144.

MADIGAN J., RIKIHISA Y., PALMER J., DE ROCK E. and MOTT J. (1995)

Evidence for a high rate of false-positive with the indirect fluorescent antibody test for *Ehrlichia risticii* antibody in horses.

J. Am. Vet. Med. Assoc., 207: 1448-1453.

- MAIR T. and WILLS J. (1992)  
Chlamydia psittaci infection in horses: results of a prevalence survey and experimental challenge.  
Vet. Rec., 130: 417-419.
- MANIRE G. and GALASSO G. (1959)  
Persistent infection of HeLa cells with meningopneumonitis virus.  
J. Immunol., 83: 529-33.
- MARDH P., PAAVONEN J. and PUOLAKKAINEN M. (1989)  
Chlamydia.  
Plenum Publishing Corporation, New York.
- MARKEY B., MC NULTY M., TODD D. (1993)  
Comparison of serological tests for the diagnosis of Chlamydia psittaci infection of sheep.  
Vet. Microbiol., 36(3-4): 233-252.
- MASSUNG R., SLATER K., OWENS J., NICHOLSON W., MATHER T., SOLBERG V., OLSON J. (1998)  
Nested PCR Assay for detection of Granulocytic Ehrlichiae.  
J. Clin. Microbiol., 36(4): 1090-1095.
- MC CHESNEY A., BECERRA V., ENGLAND J. (1974)  
Chlamydial polyarthritis in a foal.  
Jam. Vet. Med. Assoc., 165(3): 259-261.
- MC CHESNEY S., ENGLAND I. and MC CHESNEY A. (1982)  
Chlamydia psittaci induced pneumonia in a horse.  
Cornell Veterin., 72: 92-97.
- MC CLARTY G. and FAN H. (1993)  
Purine metabolism by intracellular Chlamydia psittaci.  
J. Bacteriol., 175: 4662-4669.
- MC CLARTY G. and QIN B. (1993)  
Pyrimidine metabolism by intracellular Chlamydia psittaci.  
J. Bacteriol., 175: 4652-4661.
- MC GURRIN M., VENGUST M., ARROYO L., BAIRD J. (2007)  
An outbreak of Lawsonia intracellularis infection in a standardbred herd in Ontario.  
Can. Vet. J., 48(9): 927-30.
- MC ORIST S., BOID R., LAWSON G. and MC CONNELL I. (1987)  
Monoclonal antibodies to intracellular campylobacter-like organisms of the porcine proliferative enteropathies.  
Vet. Rec., 121: 421-422.



- MEISSLER M. and KRAUSS K. (1980)  
Zur Technik der Isolierung und Züchtung von Chlamydien in der Zellkultur.  
Fortschr. Vet. Med., 30: 224-230.
- MIYAMOTO C., TAKASHIMA I., KARAIWA H., SUGIURA T., KAMADA M.,  
HASHIMOTO N. (1993)  
Seroepidemiological survey of chlamydial infections in light horses Japan.  
J. Vet. Med. Sci., 55(2): 333-5.
- MIYASHITA N., NIKI Y., KISHIMOTO T., NAKAJIMA M., MATSUSHIMA T. (1997)  
In vitro and in vivo activities of AM-1155, a new fluoroquinolone, against Chlamydia spp..  
Antimicrob. Agents Chemother., 41(6): 1331-4.
- MIYASHITA N., OUCHI K., KAWASAKI K., KOMURA H., KAWAI Y., OBASE Y.,  
KOBASHI Y., OKA M. (2008)  
Evaluation of enzyme-linked-immunosorbent-assay for Chlamydophila pneumoniae-specific immunoglobulin M in acute respiratory tract infection.  
Respirology, 13(2): 299-302.
- MOORE F., MC MILLAN M., MARGARET L. and PETRAK M. (1991)  
Comparison of culture, peroxidase-antiperoxidase reaction and serum latex agglutination methods for diagnosis of chlamydiosis in pet birds.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 199: 71-73.
- MOORTHY A. and SPRADBROW P. (1978)  
Chlamydia psittaci infection in horses with respiratory disease.  
Equine Vet. J., 10: 38-42.
- MOTT J., RIKIHISA Y., ZHANG Y., REED S., YU C. (1997)  
Polymerase chain reaction and Southern blot analysis of Ehrlichia risticii in the blood and faeces of horses.  
J. Clin. Microbiol., 35: 2215-2219.
- MOULDER J., HATCH T., KUO C., SCHACHTER J. and STORZ J. (1984)  
Genus Chlamydia.  
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1, pp. 729-739.
- MULVILLE P (1991)  
Equine monocytic ehrlichiosis (Potomac horse fever): a review.  
Equine Vet. J., 23(6): 400-404.
- MUNDERLOH U., MADIGAN J., DUMLER J., GOODMAN J., HAYES S., BARLOUGH J., NELSON C., KURTTI T. (1996)  
Isolation of the equine granulocytic ehrlichiosis agent, Ehrlichia equi, in tick cell culture.  
J. Clin. Microbiol., 34: 664-670.

NAKATA K., MAEDA H., FUJII A., ARAKAWA S., UMEZU K., KAMIDONO S. (1992)  
In vitro and in vivo activities of sparflaxacin, other quinolones and tetracyclines against *Chlamydia trachomatis*.  
*Antimicrob. Agents Chemother.*, 36(1): 188-90.

NEUVONEN E., ESTOLA T. (1974)  
Occurrence of antibodies to group specific chlamydia antigen in Finnish sheep, cattle and horse sera.  
*Acta. Vet. Scand.*, 15(2): 256-63.

NYINDO M., RISTIC M., LEWIS G., HUXSOLL D. and STEPHENSON E. (1978)  
Immune responses of ponies to experimental infection with *Ehrlichia equi*.  
*Am. J. Vet. Res.*, 39, 15-18.

OGDEN N., WOLDEHIWET Z. and HART C. (1998)  
Granulocytic ehrlichiosis: an emerging or rediscovered tick-borne disease?  
*J. Med. Microbiol.* 47, 475-482.

PALMER J., BENSON C., WHITLOCK R. (1992)  
Effect of treatment with oxytetracycline during the acute stages of experimental induced equine ehrlichial colitis in ponies.  
*Am. J. Vet. Res.*, 53(12): 2300-2304.

PALMER L. and FALKOW S. (1986)  
A common plasmid of *Chlamydia trachomatis*.  
*Plasmid*, 16: 52.

PALMER J., WHITLOCK R., BENSON C. (1988)  
Equine ehrlichial colitis: effect of oxytetracycline treatment during the incubation period of *Ehrlichia risticii* infection in ponies.  
*J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 192(3): 343-5.

PANCHOLI P., KOLBERT C., MITCHELL P., REED K., DUMLER J., BAKKEN S., TELFORD S. and PERSING D. (1995)  
*Ixodes dammini* as a potential vector of human granulocytic ehrlichiosis.  
*J. Infect. Dis.*, 172: 1007-1012.

PÉREZ-MARTINEZ J., SCHMEER N. and STORZ J. (1986)  
Bovine chlamydial abortion: serodiagnosis by modified complement-fixation and indirect inclusion fluorescence tests and enzyme-linked-immunosorbent-assay.  
*Am. J. Vet. Res.*, 47: 1501-1506.

PÉREZ-MARTINEZ J. and STORZ J. (1985)  
Antigenic diversity of *Chlamydia psittaci* of mammalian origin determined by microimmunofluorescence.  
*Infect. Immun.*, 50: 905-910.

- POLLARD D., TYLER S. and ROZEE K. (1989)  
A polymerase chain reaction (PCR) protocol for the specific detection of *Chlamydia* spp..  
*Mol. Cell. Probes.*, 3: 383-389.
- POPOVICI V. and HIASTRU F. (1968)  
Isolation from horses of microorganisms of the group *Bedsonia* (in Romania).  
*Rev. Med. Vet.*, 11: 56-60.
- POPOVICI V. and HIASTRU F. (1969)  
*Bedsonia* infections in the horse.  
*Archiva vet.*, 6: 45-51.
- PRETZMAN C., RIKIHISA Y., RALPH D., GORDON J. and BECH-NIELSEN S. (1987)  
Enzyme-linked-immunosorbent-assay for Potomac horse fever disease.  
*J. Clin. Microbiol.*, 25: 31-36.
- PRINGLE J. (2004)  
Equine granulocytic ehrlichiosis: European perspective.  
*Tierärztl. Prax.*, 32(G): 89.
- PUSTERLA N., HUDER J., FEIGE K., LUTZ H. (1998)  
Identification of a granulocytic *Ehrlichia* strain isolated from a horse in Switzerland and comparison with other *Rickettsiae* of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup.  
*J. Clin. Microbiol.*, 36: 2035-2037.
- PUSTERLA N., HUDER J., WOLFENSBERGER C., LITSCHI B., PARVIS A. and LUTZ H. (1997)  
Granulocytic ehrlichiosis in two dogs in Switzerland.  
*J. Clin. Microbiol.*, 35: 2307-2309.
- PUSTERLA N., JACKSON R., WILSON R., COLLIER J., MAPES S., GEBHART C. (2009)  
Temporal detection of *Lawsonia intracellularis* using serology and real-time PCR in thoroughbred horses residing on a farm endemic for equine proliferative enteropathy.  
*Vet. Microbiol.*, 136(1-2): 173-6.
- PUSTERLA N., JOHNSON E., CHAE J., MADIGAN J. (2003)  
Digenetic trematodes, *Acanthatrium* sp. and *Lecithodendrium* sp. as vectors of *Neorickettsia risticii*, the agent of Potomac horse fever.  
*J. Helminthol.*, 77(4): 335-9.
- PUSTERLA N., MADIGAN J., ASANOVICH K., CHAE J., DE ROCK E., LEUTENEGGER C., PUSTERLA J., LUTZ H. and DUMLER J. (2000)  
Experimental inoculation with human granulocytic ehrlichia agent derived from high- and low-passage cell culture in horses.  
*J. Clin. Microbiol.*, 38: 1276-1278.

- QUEHENBERGER P., SCHULLER W. und AWAD-MASALMEH M. (1990)  
Untersuchung über das Vorkommen von Komplement bindenden Antikörpern gegen *Chlamydia psittaci* und *Toxoplasma gondii* beim Schwein in den einzelnen Bundesländern Österreichs.  
Wien. Tierärztl. Monatsschr., 77: 285-290.
- REUBEL G., BARLOUGH J., MADIGAN J. (1998)  
Production and characterization of *Ehrlichia risticii*, the agent of Potomac horse fever, from snails (Pleuroceridae: Juga spp.) in aquarium culture and genetic comparison to equine strains.  
J. Clin. Microbiol., 36: 1501-1511.
- RHABACH B., BREIDER M., GERHARDT R. and HENTON J. (1993)  
The characteristic treatment and control of equine monocytic ehrlichiosis.  
Vet. Med., 88: 448-451.
- RICHTER P., KIMSEY R., MADIGAN J., BARLOUGH J., DUMLER J. and BROOKS D. (1996)  
*Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) as a vector of *Ehrlichia equi* (Rickettsiales: Ehrlichiae).  
J. Med. Entomol., 33: 1-5.
- RIKIHISA Y. (1999)  
Clinical and biological aspects of infections caused by *Ehrlichia chaffeensis*.  
Microbes and Infection, 1(5): 367-76.
- RIKIHISA Y. (1990)  
Growth of *Ehrlichia risticii* in human colonic epithelial cells. Current issues and perspectives.  
Ann. New York Acad. Sci., 590: 104-110.
- RIKIHISA Y., PERRY P. (1985)  
Causative ehrlichial organisms in Potomac horse fever.  
Infect. Immun., 49: 513-517.
- RIKIHISA Y., STILLIS H., ZIMMERMAN G. (1991)  
Isolation and continuous culture of *Neorickettsia helminthocoeca* in a macrophage cell line.  
J. Clin. Microbiol., 29: 1928-1933.
- RIKIHISA Y., ZHANG C., KANTER M., CHENG Z., OHASHI N., FUKUDA T. (2004)  
Analysis of p51, groESL and the major antigen P51 in various species of *Neorickettsia*, an obligatory intracellular bacterium that infects trematodes and mammals.  
J. Clin. Microbiol., 42(8): 3823-6.

- RISTIC M., HOLLAND C., DAWSON J., SESSIONS J. and PALMER J. (1986)  
Diagnosis of equine monocytic ehrlichiosis (Potomac Horse Fever) by indirect immunofluorescence.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 189: 39-46.
- SACHSE and GROSSMANN (2002)  
Chlamydial diseases of domestic animals-zoonotic potential of the agents and diagnostic issues.  
Dtsch. Tierärztl. Wschr., 109(4): 142-8.
- SAIKI R., GELFAND D., STOFFEL S., SCHARF S., HIGUCHI R., HORN G., MULLIS K. and ERLICH H. (1988)  
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.  
Science (Washington), 239: 487-491.
- SCHMATZ A., SCHMATZ H., WEBER A., SAILER I. (1977)  
Seroepidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen von Chlamydien bei Haus- und Wildtieren.  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 90: 74-76.
- SCHMEER N. and KRAUSS H. (1982)  
Purification of genus-specific chlamydial antigen and its separation into several components by ion-exchange chromatography.  
J. Clin. Microbiol. 15: 803-834.
- SCHMEER N., KRAUSS H., WERTH D. and SCHIEFER H. (1987)  
Serodiagnosis for Q fever by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).  
Zbl. Bakt. Hyg., A 267: 57-63.
- SCHMEER N., JAHN G., BIALASIEWICZ A., WEBER A. (1987)  
Die Katze als mögliche Infektionsquelle für Chlamydia-bedingte Keratokonjunktivitis beim Menschen.  
Tierärztl. Prax., 15: 201-204.
- SHANKARAPPA B., DUTTA S., SANUSI J., MATTINGLY B. (1989)  
Monoclonal antibody-mediated, immunodiagnostic competitive enzyme-linked immunosorbent assay for equine monocytic ehrlichiosis.  
J. Clin. Microbiol., 27(1): 24-8.
- SHEWEN P. (1980)  
Chlamydial infection in animals: a review.  
Can. Vet. J., 21: 2-11.
- SMITH R. and RISTIC M. (1977)  
Ehrlichiae in parasitic protozoa.  
Academic Press, New York, 295-328.

- STAMP J., MC EWEN A., WATT J. and NISBET D. (1950)  
Enzootic abortion in ewes: Transmission of the disease.  
Vet. Rec., 62: 251-254.
- STANNARD A., GRIBBLE D. and SMITH R. (1969)  
Equine ehrlichiosis: A disease with similarities to tick-borne fever and bovine petechial fever.  
Vet. Rec., 84: 149-150.
- STING R., NAGEL C., STENG G. (1997)  
Significance of causes of infectious abortion in sheep flocks in northern Baden-Württemberg with special reference to *Chlamydia psittaci*.  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 110(1): 5-11.
- STORZ J. (1971)  
Chlamydia and chlamydia induced diseases.  
Charles C. Thomas Publishing, Springfield Illinois, USA.
- STORZ J. (1988)  
Overview of animal diseases induced by chlamydial infections  
Microbiology of Chlamydia.  
CRC Press, Boca Raton, Florida: 167-192.
- STUDDERT M. (1969)  
The occurrence of complement fixing antibody to the *Chlamydia* group antigen in horses.  
Aust. Vet. J., 45(12): 595-6.
- SUMPTION K., WRIGHT D., CUTLER S. and DALE B. (1995)  
Human ehrlichiosis in the UK.  
Lancet, 346: 1487-1488.
- THAKER S., DUTTA S., ADHYA S. and MATTINGLY-NAPIER B. (1990)  
Molecular cloning of *Ehrlichia risticii* and development of a gene probe for the diagnosis of Potomac horse fever.  
J. Clin. Microbiol., 28(9): 1963-1967.
- THEEGARTEN D., SACHSE K., MENTRUP B., FEY K., HOTZEL H., ANHENN O. (2008)  
*Chlamydophila* spp. Infection in horses with recurrent airway obstruction: similarities to human chronic obstructive disease.  
Respir. Res., 9:14.
- THIELE D., KARO M. and KRAUSS H. (1992)  
Monoclonal antibody based capture ELISA/ELIFA for the detection of *Chlamydia psittaci* in veterinary clinical specimens.  
Zbl. Bakt., 277: 39-48.

- TIMMS P., EAVES F., GIRJES A. and LAVIN M. (1988)  
Comparison of *Chlamydia psittaci* isolates by restriction endonuclease and DNA probe analysis.  
*Infect. Immun.*, 56: 287-290.
- TIMONEY J., GILLESPIE, J., SCOTT F., BARLOUGH, J. (1988)  
The Rickettsiaceae.  
*Microbiol. and Inf. Dis. of Dom. Anim.*, 8: 326-331.
- TRIBBY I. (1970)  
Cell wall synthesis by *Chlamydia psittaci* growing in L cells.  
*J. Bacteriol.*, 104: 1176-1188.
- VAN DER KOLK J., DE GROOT J. (1991)  
Equine monocytic ehrlichiosis, a review.  
*Tijdschr. Diergeneeskd.*, 116(14): 721-727.
- VAN DER KOLK J., VAN DER WIJDEN M., JONGEJAN F. (1993)  
Equine granulocytic ehrlichiosis, a review.  
*Tijdschr. Diergeneeskd.*, 118(7): 227-229.
- VANROMPAY D., DUCATELLE R., HAESEBROUCK F. (1992)  
Diagnosis of avian chlamydiosis. Specificity of the modified Giménez staining on smears and comparison of the sensitivity of isolation in eggs and three different cell cultures.  
*J. Vet. Med. B.*, 39: 105-112.
- VANROMPAY D., VAN NEROM A., DUCATELLE R. and HAESEBROUCK F. (1994)  
Evaluation of five immunoassays for detection of *Chlamydia psittaci* in cloacal and conjunctival specimens from turkeys.  
*J. Clin. Microbiol.*, 32: 1470-1474.
- VEERARAGHAVAN N. and SUKUMARAN P. (1953)  
Scientific report, Madras, in Pasteur Institute of Southern India, Coonoor.
- VERMINNEN K., VAN LOOCK M., HAFEZ H., DUCATELLE R., HAESEBROUCK F., VANROMPAY D. (2006)  
Evaluation of a recombinant enzyme-linked-immunosorbent-assay for detecting *Chlamydophila psittaci* antibodies in turkey sera.  
*Vet. Res.* 37(4): 623-632.
- VEZNIK Z., SVECOVA D., POSPISIL L., DIBLIKOVA I. (1996)  
Detection of chlamydiae in animal and human semen using direct immunofluorescence.  
*Vet. Med. (Praha)*, 41(7): 201-6.

VON LOEWENICH F., STUMPF G., BAUMGARTEN B., RÖLLINGHOFF M., DUMLER J. and BOGDAN C. (2003)

A case of equine granulocytic ehrlichiosis provides molecular evidence for the presence of pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* (HGE agent) in Germany.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 22: 303- 305.

VREDEVOE L., RICHTER J., MADIGAN J. and KIMSEY R. (1995)

Ecological association between *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) and the spatial and temporal distribution of equine ehrlichiosis in Northern California, p.166.

Proceedings of the 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the American society for Tropical Medicine and Hygiene.

WARD M. and MURRAY A. (1984)

Control mechanisms governing the infectivity of *Chlamydia trachomatis* of rHeLa cells: mechanisms of endocytosis.

J. Gen. Microbiol., 130: 1765-1780.

WACHENDORFER G. and LOHRBACH W. (1980)

Recent findings on pathogenicity of mammalian chlamydial strains.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 93: 248-251.

WHITLOCK R., PALMER J., BENSON C., ACLAND H., JENNY A. and RISTIC M. (1984)

Potomac horse fever: Clinical characteristics and diagnostic features.

Am. Ass. Vet. Lab. Diag. Annu. Proc., 27: 103-124.

WILLEBERG P., RUPPANNER R., BEHYMER D., HAGHIGHI S., KANEKO J., FRANTI C. (1980)

Environmental exposure to *Coxiella burnetii*: a seroepidemiologic survey among domestic animals.

Am. J. Epidemiol, 111: 437-443.

WILLIAMS N., HARRISON L. and GEBHART C. (1996)

Proliferative enteritis in a foal caused by *Lawsonia intracellularis*-like bacteria.

J. Vet. Diagn. Invest., 8: 254-256.

WITTENBRINK M. u. BISPING W. (1987)

Bakteriologische Diagnostik des enzootischen Abortes der Schafe durch Anzüchtung des Erregers (*Chlamydia psittaci*) in der Zellkultur.

Tierärztl. Umsch., 42:124-133.

WITTENBRINK M. (1999)

Aetiological significance of chlamydial infections in equine reproduction disorders.

Pferdeheilk., 6: 538-540.



- 
- WOODLAND R., EL-SHEIKH H., DAROUGAR S. and SQUIRES S. (1978)  
Sensitivity of immunoperoxidase and immunofluorescence staining for detecting  
Chlamydia in conjunctival scrapings and in cell culture.  
J. Clin. Pathol., 31: 1073-1077.
- WUERSCH K., HUESSY D., KOCH C., OEVERMANN A. (2006)  
Lawsonia intracellularis proliferative enteropathy in al filly.  
J. Vet. Med. Physiol. Pathol. Clin. Med., 53(1): 17-21

## **9. Anhang**

### **9.1 Chemikalien und Reagenzien allgemein**

ABTS	Fa. Boehringer, Mannheim
Acidium citricum	Fa. Merck, Darmstadt
Agarose	Fa. Appligene, Heidelberg
Amphotericin	Fa. Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Fa. Sigma, Taufkirchen
Cycloheximid	Fa. Serva, Heidelberg
DMSO	Fa. Sigma, Taufkirchen
EDTA	Fa. Sigma, Taufkirchen
Eisessig	Fa. Merck, Darmstadt
Ethanol (95%)	Fa. Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Fa. Serva, Heidelberg
Fischgelantine	Fa. Sigma, Taufkirchen
Fötales Kälberserum	Fa. Roth, Karlsruhe
Gentamycin	Fa. Serva, Heidelberg
Glucose	Fa. Merck, Darmstadt
HCL	Fa. Merck, Darmstadt
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fa. Merck, Darmstadt
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Fa. Merck, Darmstadt
Isopropanol	Fa. Merck, Darmstadt
KCL	Fa. Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fa. Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Fa. Serva, Heidelberg
L-Glutaminsäure-Monokaliumsalz	Fa. Sigma, Taufkirchen
Malachitgrün	Fa. Merck, Darmstadt
Methanol (99%)	Fa. Roth, Karlsruhe

---

MgCl <sub>2</sub>	Fa. Roche, Mannheim
Natriumacetat	Fa. Merck, Darmstadt
NaCl	Fa. Merck, Darmstadt
NaHCO <sub>3</sub>	Fa. Roth, Karlsruhe
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fa. Roth, Karlsruhe
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fa. Merck, Darmstadt
NaOH	Fa. Merck, Darmstadt
Neufuchsin	Fa. Merck, Darmstadt
Nystatin	Fa. Serva, Heidelberg
Phenol (4%, wässrig)	Fa. Roth, Karlsruhe
Phenolrot (Na-Salz)	Fa. Merck, Darmstadt
Proteinase K	Fa. Boehringer, Mannheim
Saccharose	Fa. Roth, Karlsruhe
Streptomycin	Fa. Serva, Heidelberg
TMB	Fa. Sigma, Taufkirchen
Tris	Fa. Roth, Karlsruhe
Trypsin	Fa. Roth, Karlsruhe
Tween 20	Fa. Roth, Karlsruhe
Vancomycin	Fa. Sigma, Taufkirchen
Vitaminkonzentrat 100x	Fa. Boehringer, Mannheim

## **9.2 KBR**

Die Reagenzien für die Komplement-Bindungs-Reaktion wurden von der Fa. Dade-Behring, Marburg bezogen und kamen entsprechend der Empfehlung des Herstellers zur Anwendung.

*Chlamydophila psittaci*-Antigen

*Chlamydophila psittaci*-Kontroll-Antigen

*Chlamydophila psittaci*-Kontroll-Serum-Positiv

Hammelblut, konserviert

Meerschweinchenkomplement, lyophilisiert

Ambozeptor

Diäthylbarbiturat-Kochsalz-Pufferlösung pH 7,3

## **9.3 ELISA**

Coatingpuffer (TBS 1):

Tris	1,21g
NaCl	5,84g
Aqua bidest.	ad 1l
pH 8,5	

Waschpuffer (TBS 2):

Tris	1,21g
NaCl	8,76g
Tween 20	5,0ml
Aqua bidest.	ad 1l
pH 8,0	

## Substratpuffer:

Acidum citricum	21g
ABTS	0,01g
Aqua bidest.	ad 1l
pH 4,2	mit NaOH
Vor Gebrauch Zusatz von 20µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /100 ml	
Substratpuffer	

## Fischgelantinepuffer:

Fischgelantine	26,9g
Waschpuffer (TBS 2)	ad 1l
pH 8,0	

**9.4 Capture-ELISA**

## Coatingpuffer:

Tris	1,21g
NaCl	5,84g
NaN <sub>3</sub>	0,2g
Aqua bidest.	ad 1l
pH 8,5	

## Waschpuffer:

Tris	1,21g
NaCl	8,76g
Tween 20	5,0ml
Aqua bidest.	ad 1l
pH 8,0	

## Blockingpuffer:

Waschpuffer	100ml
Fischgelantine pH 8,0	2,2ml

## 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin-(TMB) Substrat:

Stammlösung 1:	Natriumacetat	82,03g
	Aqua bidest.	ad 1l
	pH 5,8	

Stammlösung 2:	TMB	0,1g
	DMSO	10ml
	Aqua bidest.	10ml
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (6%)	10µl

## Gebrauchslösung (TMB-Substrat):

Stammlösung 1	11,0ml
Stammlösung 2	20,1ml
Aqua bidest.	10ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (6%)	10µl

## Stoppreagenz:

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3M)

## Fangantikörper (FAK) und Nachweisantikörper (NAK):

Monoklonaler Antikörper MAK 22 aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen (KARO, 1991).

Konjugat:

Streptavidin POD (Fa. Boehringer, Mannheim)

Kontrollantigen:

*Chlamydomophila psittaci*-Stamm 1904 aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen (KARO, 1991).

## **9.5 PCR**

Reaktionspuffer:

10 x PCR Buffer II (Fa. Perkin Elmer, Überlingen)

PCR-Primer für *Chlamydomophila psittaci* (nach POLLARD et al., 1989):

“2A“: 5' GCT TTT CTA ATT TAC ACC 3'

“2B“: 5' ATA GGG TTG AGA CTA TCC ACA T 3'

d NTP's:

Desoxyadenosintriphosphat (dATP) (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, USA)

Desoxycytidintriphosphat (dCTP) (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, USA)

Desoxiguanosintriphosphat (dGTP) (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, USA)

Desoxythymidintriphosphat (dTTP) (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, USA)

DNS-Polymerase:

Ampli-Taq-Polymerase (Fa. Perkin Elmer, Überlingen)

Aufbereitungskit Spermaproben:

QIAmp Viral RNA Mini Kit (Fa. Quiagen, Hilden)

Analytische Agarose-Gel-Elektrophorese:

Elektrophoresepuffer:

Tris	242 g
Eisessig	51 ml
EDTA (0,5 M pH 8,0)	100 ml
Aqua bidest.	ad 1l

DNS-Längenstandard:

1Kb ladder (Fa. Invitrogen, NL)

## **9.6 Kultivierungsmethode im embryonierten Hühnerei**

SPG-Puffer (Snyder I):

Saccharose	74,62g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,12g
NA <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,22g
L-Glutaminsäure	0,91g
Aqua bidest.	ad 1l
	pH 7,0



## Transportmedium:

Saccharose	68,4g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,0)	2,7g
Gentamycin	0,05g
Amphotericin B	0,025g
Aqua bidest.	ad 1l

Zusatz von 5 % fötalem Kälberserum (für 30 Minuten bei 56 °C inaktiviert und sterilfiltriert)

## Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS):

NaCl	8,0g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2g
NA <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,45g
KCL	0,2g
Aqua bidest.	ad 1l
	pH 7,4

## Farblösung Giménez-Färbung:

Karbofuchsin	100ml Neufuchsin 10% in 95% Ethanol
4% wässriges Phenol	250ml
Aqua dest.	650ml
	bei 37 °C stehen lassen

## Na-Phosphat-Puffer (0,1M):

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,2M)	3,5ml
NaHPO <sub>4</sub> (0,2M)	15,5ml
Aqua dest.	19,0ml
	pH 7,45

## Gebrauchslösung:

Karbolfuchsin	4ml
Na-Phosphat-Puffer	10ml
frisch filtrieren und innerhalb von 40 Stunden verbrauchen	

Gegenfärbung mit 0,8% wässriger Malachitgrünlösung (Fa. Fluka, Schweiz)

## Jod-Alkohol-Lösung:

Jod	2g
Methanol 90%	ad 100ml

## Eier:

SPF (Spezifisch Pathogen Frei)-Eier (Fa. Lohmann, Cuxhaven)

## Filter:

Porendurchmesser	0,4µm (Fa. Schleicher u. Schuell, Dassel)
Porendurchmesser	1,2µm (Fa. Schleicher u. Schuell, Dassel)

**9.7 Zellkulturmethode**

## Kulturmedium:

Minimal Essential Medium (MEM) mit Salzen nach Earle	
Vitaminkonzentrat (100x)	50ml
L-Glutamin (0,2M)	50ml
Aqua bidest.	ad 4,5l
pH 7,6 mit 8%igem NaHCO <sub>3</sub> einstellen	

## Wachstumsmedium 10% (WM 10%):

- + 10% FKS
- + 50µg Gentamycin/ml Medium
- + 2,5µg Amphotericin/ml Medium

## Für Wachstumsmedium ohne Antibiotikazusatz (WMOA):

- + 5% FKS

## Versenlösung:

NaCl	8,0g
KCL	0,2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,45g
EDTA	0,2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2g
Phenolrot (Na-Salz)	0,015g
Aqua bidest.	ad 1l

## Trypsinlösung:

NaCl	8,0g
KCL	0,38g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,125g
Glucose	1,0g
Tris	3,0g
Aqua bidest.	ad 700ml
pH 7,2	
Trypsin (1:250)	2,5g
	ad 1l Aqua bidest. und Sterilfiltration

## Trypsin-Versen-Lösung:

Versenlösung	80ml
Trypsinlösung	20ml

## Zellen:

BGM-Zellen	(Fa. Flow, Meckenheim)
------------	------------------------

**9.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Automatischer Wendebrüter	Fa. Schumacher, Lardenbach
Brutschrank	Fa. Memmert, Schwabach
Costar-Transtar-96-Waschgerät	Fa. Costar, Großbritannien
Eppendorf Tischzentrifuge (5415C)	Fa. Eppendorf, Hamburg
Elektrophoresekammer (GNA100)	Fa. Pharmacia, Freiburg
Beckman-Kühlzentrifuge (J2-21)	Fa. Beckman, USA
Lichtmikroskop Diavert	Fa. Leitz, Wetzlar
Mikrowellengerät	Fa. Siemens, München
Multiskan Ascent-Mehrkanalphotometer	Fa. Labsystem, Frankfurt
Sterilbank Laminar Air Flow 100	Fa. Galaire, Italien
Thermocycler (Gene Amp PCR System 9600)	Fa. Perkin Elmer, Überlingen
Ultraschallgerät (Labsonic 2000)	Fa. Braun, Melsungen

## **10 DANKSAGUNG**

Ein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes. Auch für das jederzeit entgegengebrachte Vertrauen und die Geduld bis zur Fertigstellung dieser wissenschaftlichen Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem Fr. Dr. C. Jäger und Herrn Dr. W. Herbst für die stets nützliche und sehr gute Betreuung dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt auch den Veterinärmedizinisch-Technischen Angestellten Fr. E. Schmidt, Fr. A. Heß, Fr. R. Weil und Fr. R. Frank für die Einarbeitung in die zur Anwendung gekommenen Untersuchungsmethoden.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn C. Eichert und meiner Frau N. Hirschhäuser für die Beratung bei Fragen hinsichtlich Software und des Layouts.

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5536-3



9 783835 955363

© Kseniya Abramova - Fotolia.com